

**Analysen an Orthopockenviren
über Beziehungen
zwischen Partikelkonzentration,
Infektiosität und Reaktion im ELISA**

Maria Guggenberger

Disbui. München

1989





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0073

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. H. Mahnel

**Analysen an Orthopockenviren
über Beziehungen zwischen Partikelkonzentration,
Infektiosität und Reaktion im ELISA**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Maria Guggenberger
aus
München

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. H. Mahnel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 28. Juli 1989

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1 Die Orthopockenviren	2
2.2 Struktur und Proteine der Orthopockenviren	4
2.3 Biologischer und serologischer Nachweis der Orthopockenviren	12
2.3.1 Nachweis über die Vermehrung in Zellkulturen	12
2.3.2 Serologischer Antigennachweis	18
2.3.3 Erfassung im Elektronenmikroskop	22
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	28
3.1 Abkürzungsverzeichnis	28
3.2 Material und Methoden	30
3.2.1 Zellkulturen	30
3.2.2 Virusstämme	31
3.2.3 Stammsuspensionen	33
3.2.4 Messung der Infektiosität im Mikrotiterverfahren	33
3.2.5 Virustitrierung mittels Plaquetest	34
3.2.6 ELISA	35
3.2.7 Elektronenmikroskopie	38
3.2.8 Inaktivierungsverfahren	40
3.3 Versuche und Ergebnisse	42
3.3.1 Die quantitativen Untersuchungen an Orthopockenvirus-Suspensionen im Überblick	42
3.3.2 Vergleich der Infektiosität nach Auswertung in Endverdünnungs- und Plaquezählmethode	44

3.3.3 Beziehungen zwischen der Infektiosität und den im Elektronenmikroskop gezählten Viruspartikeln	50
3.3.4 Quantitative Vergleiche mit dem ELISA	56
3.3.5 Reaktion im ELISA von inaktivierten Orthopockenviren	65
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	72
5. ZUSAMMENFASSUNG	78
6. LITERATURVERZEICHNIS	82

1. EINLEITUNG

Seit Jahrzehnten kann man die Orthopockenviren, zu denen Spezies wie Variola, Vaccinia, Affenpocken, Kuhpocken u.a. gehören, in Versuchstieren, Hühnerbrutei und auch in Zellkulturen züchten und nachweisen. In Schnitten von pockeninfiziertem Gewebe erkennt man sie an den typischen Einschlusskörperchen, seit einiger Zeit sind sie dort durch spezifische Immunofluoreszenz identifizierbar. Seit dem 2. Weltkrieg lassen sie sich auch im Elektronenmikroskop in geeigneten Proben finden und in jüngster Zeit wurde zudem der diagnostische ELISA für den Antigennachweis etabliert.

Die Nachweisverfahren für Orthopockenviren gehören heute zur Routine. Trotzdem sind die qualitativen und insbesondere die quantitativen Beziehungen zwischen den wichtigen Nachweismethoden bisher nicht näher und vergleichend untersucht worden. Die Verhältnisse von vermehrungsfähigen zu inaktiven Orthopockenviren, zur Viruspartikelzahl und zur antigenen Reaktivität sind dabei nicht nur von praktischem Wert für Empfindlichkeit und Aussagekraft diagnostischer Tests, sondern mehr noch von wissenschaftlichem Interesse für die Beurteilung von Vermehrungstendenz, Infektiosität und Antigenität der Orthopockenviren.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, über quantitative Untersuchungen vergleichend mit verschiedenen Orthopockenviren einen Beitrag zur Aufklärung dieser Beziehungen zu leisten.

2. SCHRIFTTUM

(vgl. 3.1 Abkürzungsverzeichnis)

2.1 Die Orthopockenviren

Das International Committee on Taxonomy of Viruses teilte die Familie der Poxviridae in die beiden Subfamilien Chordopoxvirinae und Entomopoxvirinae ein (MATHEWS, 1982). Die derzeit etwa 40 bekannten Pockenviruspezies der Vertebraten, die sich ihrerseits wieder vielfach in Varianten und Stämme unterteilen lassen, wurden in sechs Genera eingeordnet: Orthopox-, Parapox-, Avipox-, Capripox-, Leporipox-, Suipoxvirus und eine noch unklassifizierte Untergruppe von drei selbständigen, tumorartige Proliferationen hervorrufenden Viruspezies.

In dem Genus Orthopox, dessen Spezies und Stämme alle immunologisch-serologisch eng verwandt sind, werden sowohl die wichtigsten, auch auf den Menschen übertragbaren Tierpockenviren (Kuh-, Büffel-, Kamel-, Kaninchen- und Mäusepockenvirus¹) zusammengefaßt als auch das für die originären Menschenpocken verantwortliche Variola- bzw. Alastrimvirus.

Zu den Orthopockenviren (OPV) gehört auch das Vacciniavirus (VV), das ursprünglich 1796 von JENNER aus einer "Kuhpocke" eines Kindes gewonnen und zu einer ersten Impfung gegen Menschenpocken verwendet wurde (MAYR und MUNZ, 1965; FENNER, 1979). Die Abstammung des heutigen VV, "ob von originären Kuhpocken oder von einem natürlich vorkommenden Vacciniastamm", ist aus heutiger Sicht jedoch nicht mehr feststellbar. Mittels kontinuierlicher Passagen in verschiedenen Wirtssystemen, überwiegend im Rahmen der Gewinnung von Impfstoffvirus, und wahrscheinlich über zusätzliche Mutationen, selektierte man aus diesem Feldvirus wie auch aus Impfpocken der Menschen in nahezu 200 Jahren eine Vielzahl von VV-Stämmen an verschiedensten Orten der Welt (Abstammungshinweise bei WOKATSCH, 1972; MAHNEL, 1974; ARITA und TAGAYA, 1980).

Generell können zwei Arten von VV unterschieden werden: Dermovaccinia- und stärker pathogene Neurovaccinia-Stämme

¹ einziger nicht humanpathogener OPV-Stamm

(WOKATSCH, 1972). Zur weiteren Differenzierung ist eine Überprüfung der biologischen Marker notwendig (MAYR et al., 1975; MAYR, 1976).

Elefanten- und Pferdepocken gelten nach internationaler Systematisierung vorerst nicht als selbständige Spezies sondern als Varianten des VV.

Das VV besitzt das breiteste Wirts- und Antigenpektrum innerhalb der Pockenvirus-Gruppe (These vom "Urpockenvirus" bei MAYR und MUNZ, 1965) und erzeugt bei den Tieren unterschiedlich verlaufende Krankheiten (MAYR et al., 1984; ROLLE und MAYR, 1984).

Die weltweite Verbreitung des VV über die Pockenschutzimpfung des Menschen mit Lebendimpfstoffen hat zwar zur Tilgung der Menschenpocken geführt, löste aber gleichzeitig sporadische Erkrankungen bei Haus- und Zootieren (v.a. Elefanten) aus. Inwieweit nach Aufhebung der Impfpflicht das VV als Erreger bei tierischen Pockeninfektionen fungiert, bleibt noch zu klären. Zum Beispiel werden für die in Indien bis 1988 aufgetretenen "Büffelpocken", vermutliche Nahverwandte des VV, verantwortlich gemacht (BAXBY et al., 1986). Im folgenden nur wenig beispielhaft aufgeführte Literaturhinweise unterstreichen jedoch die Aktualität tierspezifischer OPV bei Haus-, Zoo- und Wildtieren der letzten zwei bis drei Jahre in Europa, UdSSR, Afrika, Nordamerika und Asien.

Dies gilt vor allem für das Affenpockenvirus, das bei Affen und auch bei nichtgeimpften Menschen schwere, variolaähnliche Erkrankungen meist mit Todesfällen auslösen kann (JEZEK et al., 1987a; JEZEK et al., 1987b; MARENNIKOVA et al., 1987a; JESZEK et al., 1988a; JEZEK et al., 1988b; JEZEK et al., 1988c; ESPOSITO et al., 1988). Somit erscheint trotz fehlender epidemiologischer Faktoren eine Überwachung durch verschiedene Gesundheitsorganisationen auch zukünftig sinnvoll.

Eine weitere, weniger gefährliche Zoonose mit gehäuftem Auftreten in Deutschland und Großbritannien kann verursacht werden durch Kuhpocken- oder kuhpockenähnliche Viren (MAHNEL, 1986; HORZINEK et al., 1986; BENNET et al., 1986; BAXBY et al., 1987; NASEMANN et al., 1987). Als Überträger, die selbst ebenfalls erkranken und sich vermutlich alimentär oder per

Hautkontakt infizieren, spielen Hauskatzen eine wesentliche Rolle. Wildlebende Nager dürften ein Reservoir für Kuhpockenstämme darstellen; dasselbe wird auch für das Affenpockenvirus angenommen, nachgewiesen bei Eichhörnchen, Ratten und Kaninchen (MARENNIKOVA et al., 1987b).

Literaturangaben über Pockenfälle vergangener Jahre, die auch das Auftreten bei anderen Tierpockenspezies (v.a. Kamel-, Elefanten- und Mäusepocken) berücksichtigen, finden sich bei KERN (1987) und den bereits zitierten älteren Publikationen, wie auch bei BAXBY (1977 und BAXBY et al., 1986), der einen ökologischen Überblick gibt.

2.2 Struktur und Proteine der Orthopockenviren

Die Pockenviren gehören zu den größten menschen- und tierpathogenen Viren, zeigen in struktureller und funktioneller Hinsicht die höchste Organisationsform unter den echten Viren und vermehren sich relativ selbständig in der Zelle. Hierdurch unterscheiden sie sich von allen anderen tierpathogenen Viren grundlegend (MAYR et al., 1972).

Die **Morphologie** reifer und unreifer OPV wurde mit Hilfe enzymatischer Behandlung von Viruspartikeln, Kontrastierung mit Schwermetallsalzen und Ultradünnschnittpräparationen im **Elektronenmikroskop** erforscht, v.a. durch NAGINGTON und HORNE (1962):

Das quaderförmige, reife, infektionstüchtige OPV mit einer Größe von ca. 390 x 260 nm besitzt:

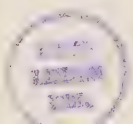
- eine äußere Hülle, bestehend aus einer Doppelmembran, in die unregelmäßig angeordnet tubuläre Proteinfilamente als Doppelhelix eingelagert sind;
- ein Oberflächenprotein zwischen Hülle und Innenkörper, in das die zwei funktionsunbekannten Lateralkörper eingebettet sind;
- einen bikonkaven bis rechteckigen Innenkörper (Core, Nukleotid), der palisadenartig umgeben ist von spikesähnlichen Fortsätzen innerhalb einer zweischichtigen Nukleoidmembran.

Der Innenkörper enthält das **Genom** der OPV, bestehend aus einer linear doppelsträngigen DNS in helixartiger Tripletform mit kovalent geschlossenen Enden über Brückenbindungen. Mittels Restriktionsenzymanalysen von gereinigter DNS wurde die genetisch enge Verwandtschaft aufgezeigt, da die Basensequenzen der DNS der einzelnen OPV 30-100% übereinstimmen; lediglich die terminalen, austauschbaren Basenpaare, die für Virulenz und Wirtsspektrum verantwortlich sind, variieren geringfügig bei den einzelnen Mitgliedern des Genus Orthopox, da sie auch der Angriffspunkt für Mutationen und Deletionsmutationen sind (MAYR, 1976; MAYR et al., 1984).

Dieses unterschiedliche pathogenetische Verhalten zeigt sich am deutlichsten bei den durch eine Vielzahl kontinuierlicher Zellpassagen virulenzgeschwächten, attenuierten VV-Stämme, z.B. MVA, unter Erhalt der immunologischen Eigenschaften und Vermehrungsfähigkeit wie ihre ursprünglichen Virusstämme. Die Virulenzabnahme, die sich phänotypisch in veränderten, wesentlich kleineren Plaques äußert, läßt sich an der Deletion auf dem linken Ende der Vaccinia-DNS und der Sequenzänderung im Genom genau lokalisieren (DALLO und ESTEBAN, 1987; PAEZ et al., 1987; PAEZ und ESTEBAN, 1988).

Das 186 Kilobasenpaare große Genom nimmt 3,2% der Virusmasse ein im Gegensatz zu 91,9% Proteinanteil und enthält eine Informationskapazität zur Kodierung von mindestens 150 - 300 **Polypeptiden**; von diesen sind in den Jahren 1967 (erste Untersuchungen nach HOLOWCZAK und JOKLIK, 1967a) stufenweise bis 1979 nach Dissoziation intakter Viruspartikel mit stark ionisierenden Substanzen (meist mit Natrium-Dodecylsulfat) in der einfachen Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese 56 Proteinbanden und im zweidimensionalen Analysensystem mindestens 111 Polypeptide einschließlich weniger Glyko- und Phosphoproteine identifiziert und anhand ihres Molekulargewichtes zwischen 8 bis 200 KD geordnet worden (ESSANI und DALES, 1979; BABLANIAN, 1984).

Es existieren spezievergleichende Elektropherogramme, die sich an dem jeweiligen Gesamtproteinmuster eines Virusstammes orientieren und als Resultat nur geringe OPV-Speziesunter-



schiede innerhalb bestimmter Molekulargewichts-Regionen aufzeigen (z.B. erstellt für verschiedene VV-Stämme, Affen-, Kuh- und Variolavirus; IKUTA et al., 1978; ARITA und TAGAYA, 1980).

Basierend auf der elektronenmikroskopisch erkannten Virusstruktur versuchte man eine Einteilung der Virusstrukturproteine einer bestimmten Virusspezies, meist VV, nach Zuordnung zu den Strukturelementen des Virions.

Bereits 1967 nahmen HOLOWCZAK und JOKLIK (1967b) bei ihren ersten Polypeptiduntersuchungen eine Trennung zwischen Core und Hülle mit Hilfe dissoziierender Detergentien wie Nonidet NP40 plus 2-Merkaptoethanol vor und gliederten die aufgetrennten Coreproteine nach ihrem Anteil an der Virusproteinmasse in Haupt- und Nebenproteine. Mit Hilfe der Unterteilung in die zwei Hauptproteinfraktionen Core und Hülle konnten TURNER und BAXBY (1979) für alle OPV vergleichend zeigen, daß die Corepolypeptidmuster bei allen OPV gleich erscheinen, dagegen Speziesunterschiede der OPV in den Oberflächen- und oberflächennahen Proteinmustern bedingt sind. Im Hinblick auf dieses wichtige Differenzierungskriterium versuchten viele Autoren (Literaturhinweise bei KERN, 1987) fast ausschließlich anhand des VV, die Proteine (KATZ und MARGALITH, 1973; PAYNE, 1978) und Glykoproteine (MOSS et al., 1971; GARON und MOSS, 1971) der Virushülle als auch die mehr peripher gelegenen Virusoberflächen- und Oberflächentubulusproteine mit Hilfe von Laktoperoxidasemarkierungen oder Trypsinverdauungen isolierter zu charakterisieren.

Eine detaillierte, sukzessive Zerlegung des Virions mittels verschiedener chemischer Detergenzien und physikalischer Auftrennungsmethoden (z.B. Zentrifugationen) in dessen Untereinheiten führte zur Klassifizierung von Haupt- und Nebenproteinen in den Lateralkörpern, verschiedenen Hüllschichten und Coreregionen sowie im Nukleoprotein (ICHIHASHI et al., 1984). Ein Überblick elektrophoretisch aufgetrennter Proteine einschließlich Molekulargewichts-Angaben, zugeordnet den Strukturelementen des Virions anhand von Ergebnissen verschiedener Autoren, gab KERN (1987).

Eine andere Einteilung viraler Proteine orientiert sich am zeitlichen Ablauf der Virussythese. Bereits 1967 nahmen HOLOWCZAK und JOKLIK (1967b) eine erste Gruppierung der Strukturproteine des VV vor, die sich nach dem Zeitpunkt der DNS-Synthese richtete und bestimmten "frühe" und "späte" Proteine, je nachdem, ob die Polypeptide vor oder nach der DNS-Replikation synthetisiert wurden. Zur Entdeckung weiterer Polypeptide, deren Auftreten bestimmten Vermehrungsphasen zugeordnet werden können, wird auf die Literatur bei KERN (1987) verwiesen.

HARPER et al. (1979) versuchten eine Identifizierung von OPV anhand der vergleichenden Untersuchung intrazellulärer Spätproteine bei Kuhpocken-, Affenpocken-, Vaccinia- und variolaverwandtem Virus.

Die Vielzahl der modernen serologischen, schnell durchführbaren Virusnachweise - bei dieser Arbeit vor allem in Hinblick auf den polyklonalen und monoklonalen Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) - erzwingen Differenzierungswege, die sich nur noch nach den **antigenen Determinanten** innerhalb der Proteinviefalt richten. Der antigene Aufbau der Pockenviren ist komplex. Man unterscheidet lösliche und virusgebundene Antigene sowie virusinduzierte Zellmembranantigene (WILCOX und COHEN 1969). Auch andere Unterteilungen, wie z.B. bei KITAMOTO et al. (1984) können getroffen werden.

Der **viruslösliche** (soluble = S) **Antigenkomplex** ist am längsten erforscht. Er entsteht bei der Virusvermehrung und ist als überschüssiges antigenes Material nicht in das Virion eingebaut, sondern in Überständen infizierter Zellkulturen und nur unvollständig im Virion nachweisbar (MAYR und MUNZ, 1965; MAYR et al., 1972). Träger des S-Antigenkomplexes ist das LS-Antigen mit einer thermolabilen (L) und einer thermostabilen (S) Komponente. Der hochmolekulare Anteil am LS-Antigen ist der immunologisch aktive und induziert komplementbindende sowie präzipitierende Antikörper, die WESTWOOD et al. (1965) anhand von 17 - 20 Präzipitationslinien im Agargelddiffusionstest mit Kaninchenantiserum nachwiesen. Zu den löslichen Antigenen gehört auch das Hämagglutinin.

Die an der **Oberfläche infizierter Zellen auftretenden Antigene** werden nach ihrer Herkunft eingeteilt in Bestandteile der Virushülle, die bei der Virus-Zell-Fusion in die Zellmembran eingebaut werden sowie eine Reihe verschiedener prä- und postreplikativ virusinduzierter Polypeptide, die vom Zellinnern an die Zytoplasmamembran transferiert werden. Zu diesen Spätproteinen wird auch das virale Hämagglutinin gezählt. MALLON und HOLOWCZAK (1985), haben diese Polypeptide mit dreierlei aufwendigen Techniken analysiert, ihr Molekulargewicht bestimmt und sie nach stündlich genauen Zeitpunkten ihres Auftretens im Vermehrungsablauf geordnet.

Im Gegensatz zu den **virusgebundenen Antigenen** haben lösliche Antigene zwar eine noch nicht identifizierte immunogene Komponente (WILCOX und COHEN, 1969 bezeichnen sie als neutralisierend), induzieren aber keine neutralisierenden Antikörper (MAYR et al., 1972). Zelloberflächenantigene spielen bei der zellulären Immunreaktion eine wichtige Rolle. Dagegen ist das breite Spektrum der virusgebundenen Antigene auf intakten Pockenviruspartikeln der Hauptauslöser für die Produktion von Antikörpern, die auch häufig in unterschiedlichem Ausmaß neutralisierend wirken können.

Diese Eigenschaft ermöglicht mit Hilfe von polyklonalen Immunsereen und in letzter Zeit verstärkt von monoklonalen Antikörpern (MAK) die Entdeckung und detaillierte Analyse virusgebundener Antigene, die überwiegend in die Oberflächenstrukturen des Virions eingebaut sind. Die Erstellung von immunmarkierten Polypeptidmustern im Blottingverfahren oder mono- und polyklonalen ELISA sind für die Diagnose und Differenzierung eng verwandter Virusvarianten, die mittels älterer serologischer Verfahren nicht unterscheidbar sind, von Bedeutung.

Seit ca. 4 Jahren häuft sich die Entwicklung von MAK, die antigenspezifische Proteine bei den verschiedenen OPV erkennen. Teilweise sind die MAK derart spezifisch, daß sie nur mit bestimmten Domänen innerhalb einer breiteren Proteinbande (Epitope) reagieren. Auf diese Weise konnte die mosaikähnliche Kombination der gemeinsamen Epitope sowie die geringe Anzahl typenspezifischer antigenen Charakteristika auf der Virusober-

fläche innerhalb des Genus OPV erforscht und damit zugleich auf immunologische Verwandtschaftsbeziehungen hingewiesen werden. Die VV und Affenpockenvirus-Stämme verhalten sich trotz unterschiedlicher Wirtsisolate bei den Affenpockenviren (Menschen, Affen, Eichhörnchen) innerhalb der jeweiligen Virusstammgruppe am einheitlichsten. Dagegen unterscheiden sich das Mäusepocken- und Kuhpockenvirus am deutlichsten sowohl voneinander als ebenso vom VV und Affenpockenvirus (ICHIHASHI und OIE, 1988).

In folgender Tabelle 1 sind die wesentlichen, antigen wirksamen Polypeptide der OPV aufgelistet, die mit Hilfe von Immunsereen oder MAK, in erster Linie gegen VV gerichtet, entdeckt wurden.

Tabelle 1: Antigen wirksame Polypeptide von OPV (nachgewiesen mittels Immunsereen oder MAK)

besondere Antigeneigen- schaft	Lokalisation im Virion	Molekular- gewicht in KD	nachgewie- sene Virusart*	Bemerkungen	Autoren
Antigene, die neutralisie- rende Anti- körper induzieren	Oberflächen- tubuli	58	VV	einzige Hauptkomponente der filamentösen Ober- flächenstruktur	STERN u. DALES, 1976a)
	Oberfläche	11 14	VV VV RPV, KPV VV	basisches Phosphoprotein besitzt mindestens 2 Epitope	HILLER u. WEBER, 1982 RODRIGUEZ et al., 1984
	Hülle	11; 28		schwächere Reaktion mit MAK	
Antigene die keine neutra- lisierende Antikörper induzieren	?	15,5	APV	reagiert streng mono- spezifisch mit erstmals beschriebenen Anti-APV-MAK	ROUMILLAT et al., 1984
Hauptantigene	Hülle Core	76 35 32	KPV VV VV	Glycoprotein des EZV sehr breite Proteinbande besitzt verschiedene Epitope	PAYNE, 1986 WILTON et al., 1986
Nebenantigene	Hülle Core	28;62 40;42;55;98 44; 60;94	VV VV KPV VV	Glycoprotein des EZV	PAYNE, 1986 WILTON et al., 1986
LS-Antigen CSA-Antigen ATIB NP-Antigen	Oberfläche Oberfläche Zytoplasma (EK) Core	100 43 160;80 65;40	alle OPV (außer: VV-Lister) KPV MPV alle OPV	virusinduziertes zell- membranassoziertes Antigen Antigen der Einschluß- körperchen vom Typ A Nukleoprotein; viele Epitope	KITAMOTO, et al., 1984, 1986, 1987

Fortsetzung Tabelle 1:

besondere Antigeneigenschaft	Lokalisation im Virion	Molekulargewicht in KD	nachgewiesene Virusart*	Bemerkungen	Autoren
HA-Antigen (Hämagglutinin)	Core	85 41	alle OPV (außer: VV-IHD-W)	spät synthetisiertes Glycoprotein, das auf Membranen infizierter Zellen transportiert wird	WILTON et al., 1986 KITAMOTO et al., 1984 IKUTA et al., 1979 DALES et al., 1983
	Hülle	10, 34, 150 89		besitzt virusgebundene ätherlösliche Komponenten; Phospholipoprotein-komplex (Phospholipid adsorbiert Hühnererythrozyten; Protein bildet antigene Determinante) Glycoproteinkomplex Glycoprotein des EZV	SMITH et al., 1973 ICHIHASHI, 1987 PAYNE, 1979
Antigene ohne besondere Kennzeichen	Oberfläche	54 32; 34; 29 17-25	VV	durch Antigenaufbereitung mit proteolytischen Substanzen sind Epitope erkennbar, von denen manche neutralisierende Antikörper induzieren	OIE u. ICHIHASHI, 1987
	Core und Zytoplasma	11	VV	Unterscheidung vom 11 KD-Protein bei Hiller u. Weber, 1982 u.a. in den 16 N-terminalen Aminosäuresequenzen	KAO u. BAUER, 1987
	Core	39	VV, RPV KPV	immunodominantes, spät synthetisiertes Protein	MAA u. ESTEBAN, 1987

* Vgl. Abkürzungsverzeichnis

Enzyme fungieren bei den Pockenviren nicht als Strukturproteine, haben jedoch Funktionen bei der Virusvermehrung. Man kennt inzwischen etwa 15 verschiedene, von denen die meisten im oder an das Core gebunden sind (tabellarisch aufgelistet bei MOSS, 1985a). Das Schlüsselenzym, welches in die Virusreplikation direkt eingreift, konnte vor 17 Jahren als erstes nachgewiesen werden. Es handelt sich um eine DNS-abhängige RNS-Polymerase, die das Uncoating, die Freisetzung der Virus-DNS im Frühstadium nach der Infektion einer Zelle initiiert. Andere Enzyme, wie Endo- und Exonucleasen, Transferasen, Phosphatasen, Kinasen und Proteasen tragen zur relativen "Autonomie" der intrazellulären Vermehrung der Pockenviren bei bzw. steuern die Replikation zumindest in den Anfangsstadien unabhängig von zellulären Enzymen und hemmen z.T. den Zellstoffwechsel. Obwohl in letzter Zeit sowohl die Molekulargewichte einzelner Enzyme (MOSS, 1985a) als auch ihre biochemischen Aufgaben bestimmt werden konnten, sind ihre genauen biologischen Funktionen noch nicht vollkommen geklärt. Mit Hilfe moderner immunologischer Verfahren - z.B. wurden durch die Entwicklung von MAK die zwei Untereinheiten (137- und 34KD-Protein) der DNS-abhängigen RNS-Polymerase beim RPV isoliert (MORRISON et al., 1985) - kann die spezifische Rolle der Enzyme im Infektionsablauf näher charakterisiert werden.

2.3 Biologischer und serologischer Nachweis der Orthopockenviren

2.3.1 Nachweis über die Vermehrung in Zellkulturen

Das biologische Verhalten der OPV in bebrüteten Hühnereiern, in Zellkulturen und in Versuchstieren wird schon seit langem erforscht. Während Versuchstiere früher zur Impfstoffherstellung (MAHNEL, 1961) und Charakterisierung der Pockenerkrankungen in den verschiedenen Wirten (CHEVILLE und AMES, 1975; MAYR et al., 1984; ROLLE und MAYR, 1984) unerlässlich waren, übernahmen Zellkulturen und in geringerem Umfang auch Bruteier immer mehr die führende Rolle bei der Züchtung, dem Nachweis und der Labordiagnose von OPV.

Die Vorgänge nach der Infektion von Zellkulturen und die daraufhin folgende Vermehrung der großen Pockenviren lassen sich mittels ultrahistologischer Untersuchungen im Elektronenmikroskop oder über die Zellpathologie, die lichtoptisch-mikroskopisch erkennbaren Zellveränderungen, verfolgen.

Das **Elektronenmikroskop** ermöglichte detaillierte Erkenntnisse über die verschiedenen, für Pockenviren eigentümlichen Phasen im Vermehrungsablauf und die zeitliche Reihenfolge der Vermehrungsschritte im Zytoplasma infizierter, permissiver Zellen (Zeittabelle und Literaturhinweise bei SCHERER, 1981; MOSS, 1985a; Übersicht bei DALES und KAJIOKA, 1964, zitiert nach PEDLEY und COOPER, 1987 sowie nach DALES und POGO, 1981, zitiert nach JANEČZKO et al., 1987).

Ergänzt wurden diese morphologischen Erkenntnisse in letzter Zeit im Zuge der Analyse von Proteinstrukturen der OPV. Bestimmte **Proteine** konnten für die Auslösung einzelner Vermehrungsschritte mitverantwortlich gemacht werden:

- Ein 58-KD-Oberflächentubulusprotein (STERN und DALES, 1976a und 1976b) soll den Eintritt des Virus in die Zelle während der Adsorptionsphase und die zellsyncytienbildende Eigenschaft durch die Infektion von Zellen vermitteln.
- ICHIHASHI und OIE (1980) fanden ein 37-KD-Glykoprotein, das Adsorption und Penetration positiv beeinflusst.
- Ein "Uncoating Protein" des Kuhpockenvirus mit 23 KD, das die Freisetzung des viralen Genoms veranlaßt, wurde von PEDLEY und COOPER (1987) beschrieben.
- Eine ähnliche Aufgabe bezüglich des Virusuncoating erfüllt das von RODRIGUEZ et al. (1987) und DALLO et al. (1987) erforschte 14 KD-Hüllprotein des VV, das zudem eine wichtige Rolle bei der virusinduzierten Zellfusion und Virus-Zell-Interaktion (Penetration) während des Infektionsvorganges spielt.
- Die Ergebnisse von OIE und ICHIHASHI (1987) bei der Erforschung peripher gelegener Oberflächenproteine ließen vermuten, daß Neutralisation nur eintrat, wenn Antikörper an die Epitope viraler Proteine gebunden und damit bestimmte aktive Funktionen dieser Proteine bei der Virusvermehrung

geblockt werden. Das 54-KD-Protein, und zwar nur die trypsininstabile TVP 41-K-Komponente, die das Epitop A trägt, sowie die 34- und 17-25-KD-Proteine nehmen eine wesentliche Funktion bei der Viruspenetration ein. Den 32- und 29-KD-Proteinen und der trypsinabspaltbaren Fraktion mit dem Epitop B des 54-KD-Proteins wird eine Schlüsselrolle bei der Virusadsorption zugesprochen.

- HILLER und WEBER (1985) berichten über ein 37 KD-Polypeptid des VV, das jedoch nur bei extrazellulären Viruspartikeln (EZV) vorkommt. Die bei der Vermehrung des Kaninchenpockenvirus entstehenden reifen Viruspartikel teilten APPLEYARD et al. (1971) in zwei Gruppen ein, nämlich in die im Zytoplasma verbleibenden, den Hauptanteil bildenden, und in die wenigen, aus der Zelle aktiv ausgeschleusten "extrazellulären" Viruspartikel, die sich im Medium infizierter Zellkulturen sammeln. Diese EZV werden bei der Ausschleusung aus der Zelle von intrazytoplasmatischen Membranen oder an der Zellmembran zusätzlich umhüllt. Diese Funktion soll das von HILLER und WEBER (1985) entdeckte Protein mit einer vom Golgi-Apparat der Wirtszelle abstammenden Membran steuern. Außer dem Besitz des EZV an diesem Protein unterscheiden sich intrazelluläre Viruspartikel (IZV) und EZV durch antigene Eigenschaften (APPLEYARD et al., 1971) und variierende Infektiosität als Funktion des Virusstammes sowie der zur Vermehrung dienenden Zelllinie (PAYNE, 1979).

Im Gegensatz zur Virusmorphogenese und Freisetzung von Pockenviruspartikel können die Vorgänge der Zellinfektion allein elektronenmikroskopisch beobachtet werden; dazu gehören

- die in kurzer Zeit erfolgende Adsorption, bei der die Interaktionen zwischen Zell- und Virusmembran mit dem daran gebundenen Zell- bzw. Wirtsspektrum immer noch Fragen offen lassen (JANEČKO et al., 1987);
- die Penetration in Form der Fusion der Virus- und Zellmembranen oder über eine Vakuole (Viropexis);
- das Uncoating (HOLOWCZEK, 1972) mit dem Auftreten viraler Enzyme, die die Virusvermehrung (Transkription, DNS-Replikation)

tion und Synthese früher und später viraler Proteine) einleiten und steuern.

Somit treten erst zunehmend im Verlaufe der Virusvermehrung, beginnend in der Eklipse, meßbare enzymatische Aktivitäten auf, die neben den optischen Anhaltspunkten als Hinweiskriterien für eine Virusreplikation gewertet werden können.

Lichtoptisch kann die Infektion von Gewebezellen schon in den ersten Infektionsstadien in Form von Elementarkörperchen und Einschlußkörperchen Typ B vermutet werden (MAYR und MUNZ, 1965).

In Zellkulturen äußern sich die OPV-verursachten pathologischen Zellveränderungen, die im Lichtmikroskop während des Vermehrungsablaufs festgestellt werden können, in drei verschiedenen Typen, die bestimmten Virus-Zell-Interaktionsphasen zugeordnet werden können (BABLANIAN, 1984):

- früh eintretende Zellabkugelung,
- Zellverschmelzungen (Zellfusion),
- späte Zellveränderungen, die den Zelltod ankündigen.

Diese morphologischen Veränderungen leiten sich biologisch und biochemisch ab aus einer frühzeitigen Veränderung der Membranpermeabilität der Wirtszelle und der späteren Hemmung der zelleigenen DNS-, RNS- und Proteinsynthese zugunsten der viralen Polypeptidsynthese (MOSS, 1985a).

Nach Zellart gering variierend treten 1,5 bis 2 Std. post infectionem, also nach der Penetration mit noch fehlenden Informationen seitens des viralen Genoms, die ersten Abrundungen der Zellen auf. Fälschlicherweise wurde früher diese Zellschädigung mit dem sogenannten cytotoxischen Effekt bei Viren mit ausbleibender Vermehrung gleichgesetzt (JOKLIK, 1966). Da eine zelluläre Antwort dieser Form auch bei Infektionen mit folgender Virusvermehrung sowie bei inaktivierten Viren als einziger cythopathischer Effekt (cpE) beobachtet wird, ist die Ursache des schädigenden Effekts weniger in einer "toxischen Viruskomponente" zu suchen als vielmehr in der frühzeitigen Anwesenheit zellproteinsynthesehemmender Faktoren, die die Umstellung des Zellstoffwechsels im Hinblick auf die virale Re-

plikation begünstigen. Ferner unterscheiden sich die "echten" cytotoxischen Effekte, z.B. des nicht vermehrt- und passierbaren Hühnerpockenvirus in bestimmten Zelllinien, optisch von denen der in zu hoher Konzentration verimpften OPV, die nach kurzer Zeit in ihre virusspezifischen cpE übergehen (MAHNEL, 1965).

Die späten Zellveränderungen finden erst ab etwa der 8. Std. p.i. nach der dazu unbedingt erforderlichen Virus-DNS-Synthese statt.

Währenddessen kommt es bei der Vermehrung aller Pockenviren an den Orten der DNS-Replikation im Zytoplasma, den sogenannten "Virusfabriken", zur Bildung von basophilen Einschlusskörperchen (EK) und Granula, in denen besondere Virusvorstufen nachgewiesen werden konnten. Azidophile EK kommen nur bei bestimmten Vaccinia- und Variolavirusstämmen (als Guarnieri'sche-EK), beim Kuhpockenvirus (als Downie'sche-EK), beim MPV (als Marchal'sche-EK) und beim HPV (als Bollinger'sche-EK) in Betracht.

Im Ablauf der Virusreplikation kommt es schließlich zum Verlust der Zellintegrität, woran Zellverschmelzungen beteiligt sein können. Die Zellfusion geschieht nur bei bestimmten Virusstämmen. Das Phänomen der mehrkernigen Riesenzellbildung scheint deshalb an eine noch unbekannte, mit dem Virus verbundene Komponente gekoppelt zu sein (ICHIHASHI et al., 1971). Die späte, zelluläre Veränderung schließt alle Mechanismen ein, die zum endgültigen Absterben der Zelle beitragen, z.B. durch den Verlust der Zellintegrität und der Zerstörung der Zellmembran. Hauptauslöser dieses cytotoxischen Faktors soll ein Spätprotein mit 30-100 KD sein, das eine Beziehung zu den Oberflächentubuli unterhält. Diese Stufe der pathologischen Zellveränderung im Zusammenhang mit der Virusvermehrung und -freisetzung (vgl. die verschiedenen Mechanismen bei SCHERER, 1981) führt letztlich ab etwa der 16. Std. p.i. bei allen OPV in permissiven Zellkulturen zu einem mikroskopisch erkennbaren, virusstammtypischen cpE, dessen Prägung im Gegensatz zum frühen cpE in Form der Zellabkugelungen im Genom verankert ist (vgl. 2.2).

Dieser cpE nimmt in der virologischen Forschung eine wichtige Stellung ein:

1. Da ein deutlich ausgeprägter cpE immer Ausdruck für eine Virusvermehrung darstellt, wird das Phänomen des cpE rein qualitativ zur Auswahl des Zellkulturspektrums benutzt, das für die Züchtung des Virus am besten geeignet erscheint. MAYR (1955) veröffentlichte im älteren Schrifttum, daß neben Plasma- und Maitland-Kulturen die Einschicht-Zellkultur für die VV-Züchtung Verwendung finden kann. Zur Herstellung dieser Gewebekultur kamen vor allem noch primäre Zellkulturen aus Zunge, Muskulatur, Haut und Amnion von Rinderembryonen, Nieren von verschiedensten Tieren, menschlichem embryonalen Gewebe und Hühnerembryonen sowie die HeLa-Zelllinie in Betracht (MAYR und MUNZ, 1965; MAYR, 1966). Der cpE nach Beimpfung dieser Kulturen zeigte verschiedene, in der Zelllysis endende Verlaufsformen, die zum einen typisch für Nierenkulturen, zum anderen spezifisch für Fibroblastenzellen waren. Im Laufe der Zeit wurden für das VV und auch andere OPV immer häufiger Hühnerembryofibroblasten- und HeLa-Kulturen verwendet (JOKLIK, 1966). Auch in jüngster Vergangenheit dient die HEF-Kultur immer noch als optimales Vermehrungssystem für die VV, das für cpE-Studien und für die Erstellung von Vermehrungskurven die beste Eignung zeigt (REDDY und SETHI, 1983).

Eine Auflistung des Zellkulturspektrums für verschiedene Virusarten, u.a. auch für die OPV-Mitglieder VV, Variola-, Kuhpocken-, Mäusepocken- und Kaninchenpockenvirus findet sich bei MAYR et al. (1974). Dabei zeigt sich, daß das VV ein sehr breites Wirts- und Zellkulturspektrum besitzt, das eine Züchtung auf fast allen Zellarten erlaubt. An derselben Literaturstelle werden verschiedene zellmorphologische Effekte bei der Virusvermehrung sowie unterschiedliche Formen des cpE diskutiert.

2. MAHNEL (1974) charakterisierte ausführlich die einzelnen Angehörigen der OPV innerhalb des Genus überwiegend anhand ihrer biologischen Eigenschaften. Ein wichtiges qualitatives Merkmal des VV, Kuhpocken-, Büffelpocken-, Elefantenpocken-, Affenpocken- und Kamelpockenvirus ist auch in die-

ser Untersuchung der virusarttypische cpE bei der Vermehrung in Hühnerembryofibroblasten- und Kälberhodenprimärkulturen, der einem von drei unterscheidbaren Plaquetypen zugeordnet und ferner nach Zeiteintritt und Größe der Plaquebildung charakterisiert wird.

3. Der cpE nimmt als Zeichen der Vermehrung von schon sehr kleinen Virusmengen ferner eine Hilfsfunktion bei der Berechnung des infektiösen Virusgehaltes einer Virussuspension ein (BONIN, 1979). Bei der Titerberechnung lassen sich durch den cpE die quantitativen Grenzen der Virusvermehrung einer hoch verdünnten Virussuspension ausdrücken. Durch diese "optische Rechenhilfe" ist eine quantitative Ergänzung der ultrahistologischen Betrachtung über die Virusreplikation möglich.

Vermehrungskurven vermitteln die Anzahl der pro Zeiteinheit gebildeten infektiösen Partikel in den verschiedenen Vermehrungsstadien. Dabei können voneinander getrennte Vermehrungslinien für IZV und EZV erstellt werden (PAYNE, 1980; HORNSTEIN, 1987). Die Angaben über die maximale Anzahl der pro Zelle gebildeten Partikel schwankt zwischen etwa 500 (PAYNE, 1979) bis zu 10.000 (MOSS, 1985b) und ist abhängig von Zell- und Virusart.

2.3.2 Serologischer Antigennachweis

Zwischen den Genera der "Poxviridae" bestehen keine serologischen und immunologischen Beziehungen, sieht man von dem allen Pockenviren gemeinsamen, im Innenkörper verankerten präzipitierenden Antigen ab (MAYR et al., 1972). Im Rahmen der Differenzierung der Pockenviren sind deshalb die meisten serologischen Nachweisverfahren in erster Linie genusbezogen. Innerhalb des Genus Orthopoxvirus jedoch sind alle Virusarten deutlich bis vollständig immunologisch und auch serologisch verwandt, d.h., jede Infektion mit einer dieser Spezies schützt gegenüber einer Reinfektion mit einer anderen. Die einzelnen Arten der OPV charakterisiert und differenziert man überwiegend anhand ihrer biologischen Eigenschaften (vgl. Kapitel 2.3.1), weil eine serologische Typisierung derzeit nur

bedingt und ergänzend zu den biologischen Differenzierungskriterien möglich ist.

Die OPV besitzen Antigene, die sowohl frühe zelluläre als auch nachfolgende humorale Immunreaktionen auslösen (FENNER, 1979). Mit der Immunantwort werden verschiedene **Serumantikörper** induziert: (MAYR, 1955; MAHNEL, 1961; MAYR und MUNZ, 1965; MAYR et al., 1984):

- Die größte Bedeutung besitzen die virusneutralisierenden Antikörper. Nach jeder OPV-Infektion kommt es zur Bildung dieser meist jahrelang persistierenden Antikörper, die bei Revakzinationen weiter ansteigen. Auf der Bindung und Neutralisation der Infektiosität durch spezifische Immunglobuline basiert der Neutralisationstest (NT). Mit ihm können schon relativ geringe Antikörpermengen im Serum erfaßt werden (Plaques-Reduktionstest in Zellkulturen, ROLLE und MAYR, 1984).
- Hämagglutinationshemmende Antikörper geben ebenfalls einen sicheren Anhaltspunkt für eine humorale Immunität. Sie werden bei OPV-Infektionen i.d.R. ebenfalls gebildet und sind dann wochen- bis monatelang, mit Hilfe der Hämagglutinationshemmungsreaktion (HAH) nachweisbar. Nur wenigen VV-Stämmen (MAYR, 1957), wie z.B. dem V-IHD-W (WOKATSCH, 1972) und dem attenuierten Dermovacciniastamm CVA (späterer MVA-Stamm, MAYR und MUNZ, 1965), fehlt das hämagglutinierende Antigen.
- Nur kurze Zeit nachweisbare, komplementbindende Antikörper werden tierartlich unterschiedlich, altersabhängig und nicht regelmäßig bei einer Erstimpfung mit OPV gebildet. Der Nachweis erfolgt mittels der Komplementbindungsreaktion (KBR).
- Präzipitierende Antikörper gegen OPV lassen sich im Agargelpräzipitationstest (Immunodiffusionstest) nachweisen.

Alle Reaktionen können einerseits zum Nachweis von OPV-Virus, bzw. zur Typisierung des Pockengenus, andererseits zur Erfassung spezifischer Serumantikörper dienen.

Neben der vorzugsweise qualitativ verwendeten Immunodiffusion und Immunofluoreszenz (IF) stellen, abgesehen von dem technisch anspruchsvolleren NT, die HAH und vereinzelt auch die

KBR die am meisten eingesetzten quantitativen Verfahren zum Antigen- bzw. Erregernachweis dar (Methoden bei BONIN, 1973; ROLLE und MAYR, 1984).

Publikationen, die zusammenfassend und vergleichend vom serologischen Verhalten der verschiedenen OPV berichten, liegen nicht vor.

In neuerer Zeit untersuchten DUNLAP und BARKER (1973a) vorwiegend im NT mit homologen und heterologen Antiseren sowie parallel im Immunodiffusionstest die antigenen und immunogenen Unterschiede zwischen 2 konventionellen und 2 experimentellen VV-Stämmen. ESPOSITO et al. (1977) überprüften die serologischen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen 6 Stämmen des Affenpocken-, Variola-Virus und VV im Agargeldiffusionstest und in der KBR.

Während die serologisch-immunologischen Methoden zur Systematisierung der OPV wenig beitragen, erfüllen sie eine wichtige Aufgabe in der praktischen Diagnose der OPV und geben Anhaltspunkte zur Speziesbestimmung. Beispielsweise trugen signifikante quantitative Differenzen im Plaque-Reduktionstest und in der HAH zur Abgrenzbarkeit des Virusstammes OPV 85 gegenüber den OPV-Referenzstämmen bei. Eine weitgehende serologische Übereinstimmung ergab sich für den Virusstamm OPV 85 nur zum Kuhpockenvirus (MAHNEL, 1986; NASEMANN et al., 1987). BAXBY et al. (1985) und HORZINEK et al. (1986) bestätigten überwiegend im NT und im zum Teil verwendeten Agargelpräzipitationstest die Kuhpockenvirus-Ähnlichkeit eines humanpathogenen OPV, isoliert von einer Hauskatze. In serologischen Kreuzversuchen mit Hilfe der HAH und des NT ließ sich die enge Verwandtschaft des von RAMYAR und HESSAMI (1972) isolierten Kamelpockenvirus sowie des Elefantenpockenvirus von MAHNEL und BARTENBACH (1973) und GEHRING et al. (1972) zum VV erstmals nachweisen. Serologische Vergleiche leisten ferner, sowohl bei theoretischen Klassifizierungen als auch in der Diagnostik, einen Beitrag zur Stammesdifferenzierung, z.B. des Affenpockenvirus (NICHOLAS und McNULTY, 1968; ESPOSITO et al., 1977) und des VV (DUNLAP und BARKER, 1973a; ESPOSITO et al., 1977).

Ein relativ neuer aber weit verbreiteter serologischer Test sowohl für den Antikörper- als auch den Antigen-Nachweis stellt bei einer Vielzahl von Viren der ELISA dar (ROLLE und MAYR, 1984).

Der Nachweis von Serumantikörper gegen OPV im ELISA wurde bis heute gegen 2 verschiedene OPV-Arten erprobt:

- MUNZ et al. (1986) Überprüften aus aktuellem Anlaß aufgrund von weitverbreiteten Pockenausbrüchen bei Kamelen in Afrika Dromedarseren in einem ELISA mit dem vordergründigen Ziel zur serologischen Differenzierung der echten Kamelpocken gegenüber Parapocken. Sie verwendeten dazu vom Kaninchen stammende Anti-Kamel-Immunglobuline zusammen mit einem Anti-Kaninchenkonjugat und als Antigen grobgereinigtes Kamelpockenvirus in einer sogenannten "Sandwich-Technik".
- Mit Kaninchen-Hyperimmunseren gegen die eng verwandten VV, Affenpockenviren und "White Pox" erwies sich der ELISA als der am höchsten sensitive serologische Test im Vergleich zu NT, HAH und IF zur Differenzierung dieser OPV (MARENNIKOVA et al., 1981).

Eine Verbesserung der Spezifität dieses ELISA für die Diagnose von Affenpockenvirus ist als Antigen-Nachweis in Vorbereitung (MARENNIKOVA et al., 1988). Ein enzymmarkiertes Konjugat wurde von MAK, die spezifisch mit Affenpockenviren reagieren, bereits hergestellt und soll in Zukunft bei Isolaten aus Proben von Patienten und Überträgern (wildlebende Nager, insbesondere Eichhörnchen als Reservoir) zur Identifizierung des Affenpockenvirus verhelfen.

Bisher waren zeitaufwendige Untersuchungen in gut ausgestatteten Labors (Elektronenmikroskop, Beimpfung von Bruteiern und Zellkulturen, grundlegende langjährige Erfahrungen mit der Differenzierung anhand der biologischen Marker) für den Umgang mit den eng verwandten OPV und deren Diagnose erforderlich. Mit Hilfe von MAK gegen VV (CZERNY et al., 1988a) wurde die Entwicklung eines sog. "monoklonalen Antigen-ELISA" zur Differenzierung von OPV möglich und damit der polyklonale, genusspezifische Antigen-ELISA zur Diagnose der OPV ergänzt (CZERNY et al., 1988b).

2.3.3 Erfassung im Elektronenmikroskop

Seit über 20 Jahren wird für den elektronenmikroskopischen Virusnachweis die Technik der Negativkontrastierung (MÜLLER, 1970; NERMUT, 1973) zur schnellen Überprüfung von gereinigtem Kulturvirus wie auch zur Routinediagnostik direkt an klinischen Proben oder an in Zellkulturen angereichertem Virus angewandt, vor allem dann, wenn weniger arbeitsintensive Verfahren nicht verfügbar sind (ALMEIDA, 1983). Vergleiche mit modernsten immunologischen Nachweismethoden zeigten, daß das Elektronenmikroskop (EM) nach Radioimmunotest und ELISA bei Sensitivitätsabstufungen den dritten Platz vor den konventionellen serologischen Testen einnimmt (OBERT et al., 1981) und auch zukünftig bei der Entdeckung neuer Viren sowie bei der Aufklärung ätiologisch unbekannter, vermutlicher Viruserkrankungen seinen Vorrang beibehalten wird.

Parallel zu dieser qualitativen Aufgabe wird es auch zur quantitativen Partikelmessung an Virussuspensionen benutzt (MELNICK und RAPP, 1964).

Bei diesen Versuchen konnte die Sensitivität elektronenoptischer Verfahren quantitativ nachgewiesen werden. Darstellungen der unteren Nachweisgrenzen, die mit der Virusgröße korrelieren, sind für verschiedene Virusgruppen und Nachweismethoden bei HOLL und SOLISCH (1984) aufgelistet. Da die gezählten Partikel keine biologische Aktivität oder Vermehrungsfähigkeit erkennen lassen, also auch nicht infektiöse Viren erfaßt werden, kann ein elektronenoptischer Virusnachweis schon bei geringem Infektiositätstiter gelingen; eine Mindestpartikelzahl aber, bei Pockenviren z.B. von ca. 10^5 - 10^6 /ml, ist erforderlich.

Zählungen von physikalischen Viruspartikeln im EM wurden bei einer Vielzahl von Viren durchgeführt, unter anderem bei Influenza-, Vesikulärem Stomatitis- (GALASSO, 1967; ARSTILA, 1976) und Poliovirus (MELNICK und SMITH, 1962), am häufigsten aber bei Herpes- und Vacciniaviren. Die wesentlichen Veröffentlichungen vor 1965 bei verschiedenen Viren, einschließlich Pockenviren, hat SHARP (1965) zusammengefaßt. Die folgenden Literaturhinweise bezüglich wichtiger Schlußfolgerungen im

Hinblick auf diese Arbeit werden sich trotz teilweise vergleichbarer Ergebnisse bei den verschiedenen Viren auf die OPV, insbesondere VV konzentrieren.

Seit ca. 1950 wurden laufend Techniken zur Bestimmung der Partikelkonzentration in Suspensionen entwickelt und modifiziert sowie ihre Sensitivität und Genauigkeit diskutiert (SHARP, 1965; KAY, 1965; HOLL und SOLISCH, 1984). Drei Grundprinzipien fanden Anwendung:

- die Verwendung von Referenzsubstanzen, v.a. Polystyrollatex in der Adhäsionsmethode;
- das Aufspritzen des zu untersuchenden Materials auf EM-Trägernetze;
- die Sedimentation der im Untersuchungsgut enthaltenen Teilchen mittels Zentrifugation in befilmten Agarblöcken oder direkt auf das Trägernetz.

Als wesentliche Frage ergibt sich aus den Untersuchungen über die quantitativen Partikelbestimmungen im EM ihre Beziehung zu den infektiösen, vermehrungsfähigen Virusteilchen, die nur mit biologischen Verfahren zu erfassen sind:

MOSS (1974 und 1985a) publizierte folgendes: Das Verhältnis von morphologischen, im EM nachweisbaren Viruspartikeln zu den infektiösen Einheiten beträgt für VV (bei der Titration auf der Kaninchenhaut) 4 : 1 und wird bei gereinigten Virusernten aus VV-infizierten Zellkulturen wenig höher eingestuft. Dabei soll diese Verhältniszahl abhängig sein von der Adaptierung des Virusstammes an die Zellart.

Viele weitere Autoren benutzten als Maßstab für die morphologisch-infektiöse Beziehung zum einen die sogenannte

"Plaque efficiency (PE)" = Viruspartikel- oder
Elementarkörperchenanzahl zu
"Plaque-forming-units (PFU)" bzw.
"Plaquebildenden Einheiten (PBE)"
in Zellkulturen

oder = Viruspartikelanzahl (VP) zu
"Pock-forming units (PKFU)" auf der
Chorioallantoismembran (CAM);

zum anderen die sogenannte

"Quality (Q)" = $PFU/PKFU \times 1000$ zu VP

und weisen in dieser Form auf folgende, in der Tabelle 2 zusammengestellte, quantitativen Verhältnisse hin:

Tabelle 2: Quantitative Beziehungen zwischen Viruspartikelkonzentration im EM und der Infektiosität

Virusstamm*	Vermehrungs- system	Maßeinheiten Viruspartikel-Infektiosität	Bemerkungen und Autoren
VV (aus Kaninchenhaut) VV (aus Hühnerembryo)	CAM CAM	$PE = \frac{VP}{PKFU}$ 4,4 - 10,7 3,4 - 18,4	mit unterschiedlichen Methoden gereinigte oder teilweise ge- reinigte Virussuspensionen (KAPLAN u. VALENTINE, 1959, zitiert nach SHARP, 1965)
VV RPV KPV MPV	CAM CAM CAM CAM	10,6 10 68 66	gereinigtes Virus (JOKLIK, 1962)
VV VV VV VV VV	L-Zellkultur L-Zellkultur L-Zellkultur L-Zellkultur L-Zellkultur	$PE = \frac{VP}{PFU}$ > 5000 10 50 35 → 10 460 → 170	GALASSO u. SHARP (1963, zitiert nach SHARP, 1965) testeten das VV unter versch. Bedingungen: 18. Zellkulturpassage mit max. Ertrag von 6000-9000 PZ/L-Zelle; 270. Passage u. Ertrag wie bei 18. Passage 270. Passage aber frühe Virus- ernte (nach 12stündiger Inkuba- tionszeit) Veränderung des Titters durch Be- schallung von "hochqualitativen" Virus (ist Virus mit hoher Infek- tiosität) Veränderung des Titters durch Be- schallung von "niedrigqualitati- vem" Virus
VV	L-Zellkultur	2,2 → 5,9	

* Vgl. Abkürzungsverzeichnis

PE = Plaque efficiency

PKFU = Pock-forming-unit

VP = Viruspartikel

PFU = Plaque-forming-unit

Q = "Quality"

Ausführliche Diskussionen der Ergebnisse von Tabelle 2 finden sich bei SHARP (1965).

Auch neuere Veröffentlichungen bestätigen, daß die Verhältnisswerte von verschiedenen Faktoren, die bereits in der Tabelle teilweise angesprochen werden, abhängig sind:

1. Zum einen steht die Anzahl sowohl der Viruspartikel als auch der PBE in wesentlicher Funktion zum optimalen Züchtungs- und Vermehrungssystem (CAM, bestimmte Zellkulturen oder die für die Virusreplikation am besten geeigneten Versuchstiere) sowie zum Adaptationsprozess in diesem System (Passagezahl in Zellkulturen).

DUNLAP und BARKER (1973b) zeigten die Wirtsabhängigkeit der PE anhand von drei VV-Stämmen auf, die über zwei Passagen abwechselnd auf der CAM und in Hühnerembryofibroblastenkulturen vermehrt wurden im Vergleich zu ihrem Anzüchtungssystem.

GANGEMI und SHARP (1978) bewiesen die Abhängigkeit der Partikelheterogenität ebenfalls von Zellkulturen, indem sie 2 VV-Stämme, von denen einer 164 mal, der andere nur 7 mal in permissiven L-Zelllinien vermehrt wurde, in 2 verschiedenen Zelllinien einschließlich der permissiven L-Zelllinie passagierten. Die durchschnittliche PBE pro 1000 VP (die in dieser Veröffentlichung etwas abgeänderte Plaquing efficiency Q gibt wieder den Vergleich der Plaquezahl zur VP an) in den für das Virus fremden RK-Zellen war um das 10-fache geringer als in den permissiven Zellen und beim L-zelladaptierten Stamm sogar unter der Nachweisgrenze.

2. Die PBE und damit indirekt die PE oder Q sind ferner abhängig von der Virusaufbereitung.

GANGEMI und SHARP (1978) gingen auf die Relation zwischen PBE und Virusaufbereitung ein, die sich nur beim nicht adaptierten Stamm bemerkbar machte, weil eine Reduktion der PBE durch Partikelaggregationen erfolgte. GALASSO und SHARP (1962 und 1964) berichteten bereits früher ausführlich über die Auswirkungen von Aggregationen auf die PBE sowie die bestmöglichen Behandlungsverfahren von Virussuspensionen zur Vermeidung dieser Probleme. SHARP und McGUIRE (1970)

und McGUIRE et al. (1973) wiesen im Zusammenhang mit anderen physikalischen VV-Eigenschaften nach, daß die PE für ausgeprägte Virusaggregationen dreimal höher ist als bei Virusfraktionen mit vielen einzelnen Virusteilchen.

3. Die "Virusqualität" (darunter wird von den meisten Autoren die Plaquezahl pro 1000 VP als Maßstab für die Infektiosität verstanden) wird entscheidend beeinflußt von verschiedenen Vermehrungsbedingungen.

GANGEMI und SHARP (1978) stellten ferner den Zusammenhang zwischen produzierter PZ pro Zelle und deren infektiösem Anteil heraus. Schon viel früher (GALASSO und SHARP (1963, zitiert nach SHARP, 1965) konnte anhand von Vermehrungskurven gezeigt werden, daß in den ersten Vermehrungsphasen zwar viele Viruspartikel pro Zelle gebildet werden können, aber nur wenige von "infektiöser Qualität". Die Anzahl dieser unreifen, vermutlich genetisch defekten Partikel soll wiederum vom Vermehrungsmodus, z.B. Länge der Inkubationszeit, abhängig sein. Außerdem spiegeln sich in Höhe und Infektiosität der Partikelanzahl bestimmte Kultureinflüsse auf die Virusvermehrung, konkretisiert für verschiedene Serumzusätze in Zellkulturmedien (SHARP, 1965).

Folgendes Fazit ergibt sich aus all diesen beispielhaft zusammengestellten Bedingungen bei der Ermittlung der Partikelzahl im EM und ihrer Relation zu infektiösen Einheiten, daß nämlich die PE weder eine Maßzahl für eine Viruseigenschaft noch für die Sensitivität der Zählmethode ist, sondern vielmehr eine enorme Variationsbreite beinhaltet. Dieser Faktor kann unter optimalen Bedingungen kleiner als 10 sein, aber unter ungünstigen Verhältnissen mehr als 1000 bis zu 10.000 bei Pockenviren, insbesondere überprüft für VV, betragen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung der Virusgruppen und -stämme:

OPV	Orthopockenvirus, -viren
VV	Vacciniavirus, -viren
V-MVA	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
V-E	Vacciniavirus-Elstree
V-IHD	Vacciniavirus-IHD
V-R325	Vacciniavirus-R325
V-Bern	Vacciniavirus-Bern
V-TT	Vacciniavirus-TT
N.V.-M1	Neurovacciniavirus-M1
N.V.-Hagen	Neurovacciniavirus-Hagen
N.V.-Lev.	Neurovacciniavirus-Levaditi
APV	Affenpockenvirus
BPV	Büffelpockenvirus
CPV	Kamelpockenvirus
EPV	Elefantenpockenvirus
KPV	Kuhpockenvirus
KR-2	Kuhpockenstamm
KR-58	Kuhpockenstamm
MPV	Mäusepockenvirus
OPV-85	Orthopockenvirus 85
RPV	Kaninchenpockenvirus
AG	Antigen
AK, MAK	Antikörper, monoklonale Antikörper
BEL	Bovine embryonale Lunge
CAM	Chorioallantoismembran
cpE	cytopathischer Effekt
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
EM	Elektronenmikroskop
FKS	Fetales Kälberserum
HEF	Hühnerembryofibroblastenkulturen

IE	Infektiöse Effizienz
KD	Kilodalton (Molekulargewichtsangabe)
KID ₅₀	50% kulturinfektiöse Einheiten
MEM	Minimal Essential Medium
MG	Molekulargewicht
PBE	Plauebildende Einheiten
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Plaue Efficiency
PZ	Partikelzahl

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Zellkulturen

Zwei Arten primärer Zellkulturen, im üblichen Trypsinierungsverfahren gewonnen, und mehrere permanente Zelllinien dienten zur Virusvermehrung und als Nachweissysteme bei der Titrierung der Virusinfektiosität.

Primärkulturen aus embryonalen Rinderlungenzellen (BEL) wurden aus Rinderembryonen nach der Methode von MADIN et al. (1957) hergestellt und bei Bedarf auch Subkulturen angelegt.

Hühnerembryofibroblastenzellen (HEF) stammten aus 10 bis 11 Tage vorbebrüteten Hühnerembryonen (MAYR und KALCHER, 1960), auch Sekundärkulturen wurden verwendet.

Ferner wurden folgende Dauerzelllinien, gezüchtet als Einschichtzellkulturen, eingesetzt:

- HeLA, humane Zelllinie aus einem Epithelkarzinom;
- Ma 104, Affennierenzelllinie;
- RK-13, Kaninchennierenzelllinie;
- L929, Mäusefibroblastenzelllinie.

Alle Zelllinien wurden im Abstand von drei bis vier Tagen im Verhältnis 1 : 2 oder 1 : 3 (Methode nach MAYR et al., 1974) geteilt.

Anzucht- und Erhaltungsmedium waren für alle verwendeten Zellarten identisch.

Das Anzuchtsmedium bestand aus:

Eagles Minimal Essential Medium (MEM) mit

1% - 2,5% Natriumbicarbonat (8,8%ig)

1% Non Essential Amino Acids (NEAA)

5% Basalmedium Supplement (BMS, Seromed^R, Fa. Biochrom)

100 I. E. Penicillin/ml

100 µg Streptomycin/ml.

Das Erhaltungsmedium für dichtgewachsene Kulturen enthielt nur 2% BMS.

3.2.2 Virusstämme

18 Virusstämme, ausschließlich aus der Familie Poxviridae, Genus Orthopoxvirus (OPV), waren in die Versuche einbezogen:

Vacciniavirus (OPV commune)-Stämme (V-):

- MVA Kulturattenuiertes Virus der 566. Passage in HEF-Kulturen; (Modifiziertes Vacciniavirus Ankara, attenuierter Impfstamm; MAYR et al., 1975); V-MVA;
- Elstree Kulturadaptiertes Virus der 13. Passage in HEF-Kulturen; (WHO-Referenzstamm; Abstammung: Lister-Institute); V-E;
- IHD-J Kulturadaptiertes Virus der 3. Passage in HeLA-Kulturen; (bezogen von ATCC, d.h. American Type Culture Collection, Rockville, USA; Abstammungshinweis bei WOKATSCH, 1972); V-IHD;
- R325 Kulturadaptiertes Virus der 4. Passage in HeLA-Kulturen; (Abstammungshinweis bei WOKATSCH, 1972); V-R325;
- Bern Kulturadaptiertes Virus der 4. Passage in HEF-Kulturen; (Abstammungshinweis bei WOKATSCH, 1972); V-Bern;
- Levaditi neurovirulent, aus der 15. Passage, 1. Passage in BEL-Kulturen; (Abstammungshinweis bei WOKATSCH, 1972); V-Lev.;
- Hagen neurovirulent, aus der 30. Eipassage, 1. HEF-Kulturpassage; V-Hagen;
- M 1 neurovirulent, aus der 14. Eipassage, 1. BEL-Kulturpassage; V-M1;
- TT Kulturadaptiertes Virus der 7. Passage in HEF-Kulturen; (Rekombinante; Abstammung von chinesischem Impfstamm; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Wolf, Pettenkofer-Institut, München); V-TT;

Orthopox-Stämme:

- Kaninchenpockenvirus (OPV cuniculi); über die Brutei-Chorioallantoismembran kloniert; Virus der 1. Passage in BEL-Kulturen; RPV;
- Affenpockenvirus (OPV simiae); Stamm AP-1 Copenhagen; Virus der 2. Passage in HEF-Kulturen; (Abstammungshinweis im Literaturverzeichnis bei MAHNEL, 1974); APV;
- Mäusepockenvirus (OPV muris); Stamm MP-1 München; Virus der 5. Passage in HEF-Kulturen; (von Ektromeliekranken Mäusen isoliert, München); MPV;
- Kuhpockenvirus (OPV bovis); Stamm KR-2 Brighton (WHO-Referenzstamm); Virus der 2. Passage in HEF-Kulturen; KR-2;
Stamm KR-58, Virus der 3. Passage; in HEF-Kulturen; (Isolat Prof. Hallauer, Bern); KR-58;
- Büffelpockenvirus (OPV bubali); Abstammung Baxby; Virus der 3. Passage in HEF-Kulturen; (Abstammungshinweis im Literaturverzeichnis bei MAHNEL, 1974); BPV;
- Elefantenpockenvirus (OPV elephantis) Stamm Ep-1; Virus der 5. Passage in BEL-Kulturen; (Abstammungshinweis im Literaturverzeichnis bei MAHNEL, 1974); EPV;
- Kamelpockenvirus (OPV cameli) Stamm CP-1; Virus der 2. Passage in BEL-Kulturen; (Abstammungshinweis im Literaturverzeichnis bei MAHNEL, 1974); CPV;
- Orthopoxvirus, Stamm OPV 85; Kuhpockenähnliches Virus (isoliert 1985), Virus der 3. Passage in HEF-Kulturen und 3. Passage in BEL-Kulturen; (humanpathogen; MAHNEL, 1986; NASEMANN et al., 1986); OPV-85.

Die einzelnen Stämme wurden vor ihrer Verwendung überwiegend über 2-4 Passagen in verschiedenen Zellkulturarten vermehrt.

3.2.3 Stammsuspensionen

Zur Gewinnung von Stammsuspensionen mit höherem Virusgehalt wurden alle Virusstämme nach der Adsorptionstechnik (MAYR et al., 1974) vermehrt. Von dicht gewachsenen Zellkulturen in Roux-Flaschen wurde das Anzuchtmedium abgegossen, die Kulturen mit PBS gewaschen und mit 10 ml Virus gleichmäßig beschickt. Die infizierten Zellkulturen wurden dann etwa zwei Stunden bei 37°C inkubiert, das Impfmateriel wieder entfernt, die Kulturen erneut mit PBS gespült, schließlich mit Erhaltungsmedium beschickt und bei 37°C weiterbebrütet. Auf dem Höhepunkt der Virusvermehrung, bei ca. 80 - 90% Zerstörung des Zellrasens, wurde das Virus geerntet und mittels Gefriertauen (-70°C) die Zellen aufgeschlossen. Das virushaltige Medium (mit Zellphase) wurde ca. zwei Minuten mit Ultraschall (Branson Sonifier B 12) bei 200 - 250 Watt pulsierend behandelt und anschließend die Zelltrümmer durch niedertourige Zentrifugation (10 min ca. 2500 UpM) entfernt.

Die zellfreien Überstände bildeten die jeweilige Virusstamm-suspensionen. Sie wurden portioniert bei -70°C bis zur Verwendung konserviert.

3.2.4 Messung der Infektiosität im Mikrotiterverfahren

Der Gehalt an infektiösem Virus in den Stammsuspensionen oder anderen Proben wurde durch Titrierung in Zehnerpotenzen und Verimpfung der Verdünnungsstufen auf Mikrottestplatten mit Flachboden und 96 Vertiefungen (F-Microtest[®] III Platte, Fa. Falcon, Heidelberg) bestimmt. In jede Vertiefung der Mikrottestplatte wurden 50 µl MEM vorgelegt und dann von jeder Verdünnungsstufe in 8 Näpfchen einer Reihe 50 µl Virusverdünnung getropft. Die letzte Reihe diente als Zellkontrolle. Abschließend wurden in jede Vertiefung 100 µl Zellsuspension, eingestellt auf 250.000 Zellen/ml eingefüllt. Verwendet wurden die Zellarten, in denen die einzelnen Virusstämme vermehrt worden waren. Die Platten wurden mit Plastikfolie verschlossen und bei 37°C unter einer 5% CO₂-95% Luft-Atmosphäre bebrütet. Die Endablesung erfolgte nach 7 Tagen anhand der virusspezifi-

schen cpE, die Titerberechnung in KID₅₀/ml nach dem von SPAERMAN und KAERBER (1931) beschriebenen Verfahren.

3.2.5 Virustitrierung mittels Plaquetest

Vergleichstitrierungen der Infektiosität wurden im Plaquetest durchgeführt und über das Plaquezählverfahren ausgewertet (BONIN, 1973; MAYR et al., 1974).

In Kunststoffplatten mit 24 Vertiefungen (Nuclon[®]-Multischalen) wurde zunächst 1 ml Zellsuspension (Zellichte 250.000 MA104-Zellen/ml Anzuchtmedium) pro Öffnung eingefüllt und die Kulturen anschließend bei 37°C in einem CO₂-Begasungsbrutschrank inkubiert. Für das MPV dienten L 929-Zellen und für das CPV BEL-Zellkulturen. Teste mit dem V-MVA-Stamm entfielen, da dieser Stamm keine zählbaren Plaques produziert (MAYR et al., 1975). Im Plaquetest wurden nur diejenigen Verdünnungsstufen (log₁₀) der Virussuspension ausgewertet, die eine zählbare Plaqueanzahl erwarten ließen.

Aus jeder Vertiefung der dichtgewachsenen Kulturen wurde das Anzuchtmedium abgesaugt, die Zellkultur mit PBS gewaschen und die Vertiefungen einer Reihe mit je 0,1 ml einer Virusverdünnung überschichtet. Die 4 Vertiefungen der letzten Reihe erhielten als Zellkontrollen nur MEM. Nach der Virusadsorption von 2 Std. bei 37°C im CO₂-Brutschrank wurde das Inokulum entfernt, der Zellrasen in den Vertiefungen mit PBS gespült, mit Erhaltungsmedium überschichtet und 36 - 48 Stunden bis zur Ausbildung der Plaques weiterbebrütet. Vor der Auswertung wurde das Medium abgesaugt, die Kulturen der Testplatte abschließend gefärbt (Farbstofflösung: 0,5 ml Kristallviolett nach Witte¹ pro Vertiefung), nach ca. 3 min die Platte mit Leitungswasser gespült und getrocknet.

Plaques, die nach der Färbung der noch intakten Zellen farbfrei erschienen, konnten bei den meisten Virusstämmen mit bloßem Auge ausgezählt und mit Filzstift an der Plattenunterseite markiert werden. Die äußerst kleinen Plaques einiger weniger Stämme ließen sich nur unter dem Umkehr-Mikroskop aus-

¹ 15 g Kristallviolett + 85 ml Alkohol (absolut) + 250 ml Formalin ad. 1000 ml Aqua dest.

werten.

Der Virustiter wurde in plaquebildenden Einheiten pro ml (PBE) ausgedrückt, für dessen Berechnung die mittlere Plaquezahl der noch komplett positiven Verdünnung (am besten mit mehr als 10 Plaques pro Reagent) maßgeblich ist (ROLLE und MAYR, 1984).

3.2.6 ELISA

Drei verschiedene AG-ELISA ("Antigenfänger"), von denen zwei im monoklonalen, einer im polyklonalen System abliefen, wurden mit der Doppel-Sandwich-Technik in Flachboden-Mikrotestplatten (Immuno-Plate Maxisorp F96, Fa. Nunc, Dänemark) nach der von CZERNY et al. (1988a) entwickelten Methode durchgeführt.

Testablauf im monoklonalen ELISA:

Die Durchführung eines AG-ELISA ließ sich in die drei Hauptabschnitte gliedern: Plattenbeschichtung, AG-Nachweis und quantitative Auswertung.

Plattenbeschichtung:

96-Loch-Platten wurden primär mit MAK, den institutsintern hergestellten, aus Mäuseasozites gewonnenen und der Immunglobulin-Subklasse G 2a angehörigen anti-MVA-MAK 5B4/2F2 (Fusionsdatum 2/86) einerseits und anti-V-M1-MAK 1B3/A11 (Fusionsdatum 7/86) andererseits, beschichtet. Zuerst wurden die MAK 1:4000 in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verdünnt, dann die Platten mit 100 µl/Vertiefung beschickt. Beim Ansatz hoher Verdünnungen wurde auf die Vorverdünnung und gute Durchmischung besonders Wert gelegt. Die Bindung der MAK an die Platten erfolgte über eine Inkubation von 3 bis 4 Stunden bei 37°C und anschließende Aufbewahrung über Nacht im Kühlschrank (4°C). Beschichtete Platten wurden sofort verwendet oder für kurze Zeit bei -20°C gelagert.

AG-Nachweis:

Zwischen allen einzelnen, im folgenden beschriebenen Reaktionsschritten lagen verschieden viele Waechsvorgänge, in denen die Vertiefungen der Platte mit Waschpuffer NaCl-PP¹) mit 0,05% Tween20 (Polyoxyethylene sorbitan monolamate, Fa. Serva,

¹ Vgl. Anhang zu Abschnitt 3.2.6

Heidelberg) ausgespült und dann gründlich trockengeklopft wurden. Alle Reagentien wurden in Mengen von 100 µl je Vertiefung eingefüllt.

1. Schritt: Entnahme bzw. Auftauen der beschichteten ELISA-Platten, dreimal waschen und mit 10% FKS in NaCl-PP 60 min inkubieren;

2. Schritt: Nach drei Waschgängen Auftragen der AG-Proben; in jede Vertiefung wurde Waschpuffer vorgelegt, ausgenommen die zweite Reihe. Die erste Lochreihe der Platte (Reihe 1 der Immunoplate) wurde als Nullwert für die spätere Auswertung und zugleich als negative Kontrolle im Testsystem immer antigenfrei belassen. In die folgende Bahn (Reihe 2 der Immunoplate) wurden die Virusproben in den Versuchen entweder unverdünnt (mit 200 µl Probesuspension) oder 1:5 vorverdünnt (160 µl Waschpuffer und 40 µl Probelösung) eingefüllt und in log 2-Schritten über die Lochreihen weiterverdünnt. Das V-MVA wurde als positive Kontrolle (homologes MAK-AG) auf jeder Platte mitgeführt. Zur Bindung (AK-AG-Reaktion) wurden die Platten 60 min im Brutschrank inkubiert und anschließend viermal gewaschen.

3. Schritt: Kaninchen-anti-V-MVA-Immunserum wurde in der Gebrauchsverdünnung von 1:10000 mit NaCl-PP und 10% FKS überschichtet (alle Vertiefungen) und 30 min bei 37°C inkubiert.

4. Schritt: Nach vier Waschgängen erfolgte die Zugabe des Anti-Rabbit-Peroxidase-Konjugates (Fa. Sigma, München, Artikel-Nr. A4914) in der Konzentration 1:1000 bei gleichen Verdünnungspuffer und gleicher Inkubationszeit, es folgten fünf Waschungen.

5. Schritt: Als Substrat wurde TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylenbenzidine; Fa. Serva, Heidelberg) in Lösung²) verwendet; eine Blaufärbung entwickelte sich unter Schütteln (auf Microshake, Fa. Dynatech) innerhalb von 10 min.

6. Schritt: Durch Zugabe von 50 µl/Loch einer 2M H₂SO₄ wurde die Reaktion gestoppt, ein Farbumschlag nach gelb bewirkt.

Quantitative Auswertung:

Der Farbumschlag kennzeichnete die positive Reaktion (Bindung von OPV-AG). Die gelbe Farbreaktion in den antigenhaltigen

² Vgl. Anhang zu Abschnitt 3.2.6

Reihen war gegen den Nullwert ("Blank", 1. Reihe) photometrisch (mit Hilfe eines Titerek-Multiskan MC-Photometers) bei 450 nm Wellenlänge meßbar. Der Meßbereich des Gerätes umfaßt Extinktionswerte von 0,000 bis 2,000. Als positiv wurden Extinktionswerte beurteilt, die den doppelten Wert der Negativkontrollen überschritten ($>0,05$).

Testablauf im polyklonalen ELISA:

Im polyklonalen ELISA entsprachen alle Arbeitsschritte im Prinzip denen im monoklonalen System. Abweichungen betrafen die eingesetzten Substanzen und die Verdünnungsverhältnisse in den Reaktionsgemischen:

- Die Plattenbeschichtung wurde mit 1:4000 verdünntem, inaktivierten (30 min bei 56°C im Wasserbad) anti-V-MVA-Kaninchen-Immunserum (1986; aus institutseigenem Bestand) vorgenommen, der Virusnachweis über das Biotin-Avidin System (BIEBER, 1985) geführt. Um die wertvolle chemische Reaktion zwischen dem Vitamin (Biotin) und den 4 Bindungsstellen des Glycoproteins aus dem Hühnereiweiß (Avidin) für diese Zwecke nutzen zu können, mußte zuvor das Biotin an die polyklonalen Antikörper nach der bei BIEBER (1985) beschriebenen Technik gekoppelt werden.
- Das polyklonale Biotinkonjugat wurde im Test 1:500, das Avidin (Avidin-Peroxidase labeled von Fa. Sigman, Nr. 3151) 1:1000 verdünnt eingesetzt. Mit Hilfe der an Avidin gebundenen Peroxidase konnte wie im monoklonalen ELISA das TMB als Substrat verwendet werden.

Alle optimalen Gebrauchsverdünnungen, wie sie in den hier beschriebenen ELISA-Testen angewandt wurden, basierten auf Vorversuchen, deren Ergebnisse bereits vorlagen. Sie wurden zu Beginn der eigenen experimentellen Untersuchungen als Schachbrett-ELISA, d.h. mit variierenden Beschichtungs- und Konjugatverdünnungen, nachgeprüft und mit geringen Abwandlungen übernommen.

Anhang zu Abschnitt 3.2.6

1) NaCl-PP-Puffer: (pH 7.4)

8,0 g NaCl

0,3 g KH_2PO_4

2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

0,2 g KCl

in 1000 ml Aqua dest. lösen.

2) Substratlösung

100 mg TMB wurden in 10 ml DMSO (Dimethylsulfoxide; Fa. Serva, Heidelberg) gemischt und anschließend in 0,3 ml-Aliquots portioniert bei -20°C aufbewahrt.

Mischung des Substrats aus:

9,9 ml 0,2 M Natriumacetat

0,1 ml 0,2 M Zitronensäure

10,0 ml Aqua dest.

0,2 ml obiger TMB-Lösung

24 μl einer 1:10 verdünnten H_2O_2 -Lösung (Merck, 30%ig).

3.2.7 Elektronenmikroskopie

Die Untersuchungen wurden an einem Transmissions-Elektronenmikroskop (EM), Typ Zeiss 10 C/R, durchgeführt.

Der qualitative Nachweis von OPV war gegeben, wenn sich ein Pockenpartikel markanter Morphologie elektronenoptisch ausmachen ließ.

Für die Messung von Viruspartikel-Konzentrationen über die Auszählung im EM wurde Polystyrollatex (Fa. Balzers, Wiesbaden) als Bezugseinheit den Virusproben zugesetzt. Der Durchmesser der verwendeten Latexteilchen maß $0,312 \mu\text{m}$. In Vorversuchen wurde über eine Verdünnungsreihe in Aqua dest. die repräsentative, auszählbare Verdünnungsstufe der Latexsuspension von $10^{-3}/\text{ml}$ ausgewählt. Sie wurde bei den Partikelvergleichen letztendlich den Verdünnungen der Virusstammlösungen im Verhältnis 1:1 zugemischt.

Das für die spätere Auswertung günstigste Mischverhältnis Virus-Latex wurde an Vorproben ermittelt. An einem Tropfen Virusverdünnung (1:2, 1:3 und 1:4), auf das Trägernetz (EM-

Objekträger) aufgebracht, wurde nach 3 min Sedimentation (MÜLLER, 1970; NERMUT, 1973) die zur späteren Auszählung geeignete Virus-Verdünnungsstufe im EM ausgewählt. Anhand der Vorproben ergab sich ferner, daß bei den in Zelllinien passagierten Virusstämmen die Verdünnung mit MEM hergestellt werden konnte, während die in Primärkulturen vermehrten OPV besser mit Saline-Trypsin-Versen-Lösung zu verdünnen und anschließend 15 bis 20 min bei 37°C zu inkubieren waren. Sie wurden zudem anschließend ultraschallbehandelt und 10 min bei 3000 UpM zentrifugiert.

Die für die Auszählungen bestimmten Virus-Latex-Gemische wurden nach kurzer Ultraschallbehandlung in einer druckluftbetriebenen Tisch-Ultrazentrifuge (Airfuge; Fa. Beckman Instruments) in möglichst gleichmäßiger Verteilung auf die befilmten und kohlebedampften EM-Trägernetze aufgebracht. Der Festwinkelrotor der Airfuge wurde mit kleinen Kunststoffröhrchen à 150 µl beschickt. Jeweils ein EM-Trägernetz wird dabei in die runde Vertiefung eines Adapters gelegt, der anschließend in das Plastik-Zentrifugenröhrchen eingesetzt wurde. Jedes Röhrchen wurde dann mit 100 µl Latex-Virusgemisch aufgefüllt und nach dem Einsetzen in den kleinen Rotor 10 min bei 10 psig (entspricht 55.000 bis 60.000 UpM oder ca. 47000 g) zentrifugiert. Die EM-Trägernetze mußten danach unverzüglich aus ihren Haltern entnommen und die sedimentierten Partikel sofort mit einem Tropfen 96%igen Alkohols (Trocknung) wiederholt fixiert werden.

Anschließend erfolgte die Negativkontrastierung (MÜLLER; 1970; NERMUT, 1973) mit 0,5%iger Phosphorwolframsäure über drei min.

Die Partikelauswertung im Elektronenmikroskop wurde bei 4000-facher Vergrößerung vorgenommen. Sie erfolgte in der Weise, daß auf jedem 300-maschigem Trägernetz sämtliche Virus- und Latexpartikel von jeweils fünf Netzquadraten gezählt und alle vier Netze eines Zentrifugierlaufs zügig ausgewertet wurden. Wenn nicht alle Trägernetze in geeigneter Art beschichtet waren, mußte eine zweite Präparation und Ultrazentrifugation durchgeführt werden. Im Fall von beschichteten EM-Trägernetzen mit zuviel Zelldetritus oder zu hohen bzw. zu geringen Parti-

kelzahlen, wurde über eine Variation der Verdünnungen vor der Präparation die Auszählung von mindestens sechs Objekt-EM-Trägernetzen, erforderlich für die Berechnung der Mittelwerte, erzielt.

Die Bestimmung der Partikelzahlen/ml erfolgte unter Berücksichtigung der Verdünnungsverhältnisse und Berechnung von Mittelwerten nach der Formel von PINTERING und JOUCE (1965, zitiert nach HOLL und SOLISCH 1984):

$$PZ/ML = \frac{\text{Zahl der Viruspartikel (PZ) auf bestimmter Fläche}}{\text{Zahl der Latexpartikel (LP) auf derselben Fläche}} \cdot X$$

X = Konzentration der LP der Ausgangssuspension, die in diesem Fall laut Katalogangabe $6,1 \cdot 10^{10}/\text{ml}$ betrug.

3.2.8 Inaktivierungsverfahren

Für die Versuche wurden drei Spezies der OPV ausgewählt: V-MVA, V-E und KR-2. Die Virusstammsuspensionen wurden jeweils den sechs folgend beschriebenen chemischen bzw. physikalischen Inaktivierungsverfahren (Techniken nach MAHNEL, 1987) unterzogen.

Wärme:

Die Virussuspensionen wurden in Kahnröhrchen (Glas, 6 mm Durchmesser) in Mengen von je 2 ml abgefüllt, bei 37°C 15 min vorgewärmt, anschließend im Wasserbad bei 56°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) 20 min inkubiert und dann sofort im Eisbad gekühlt. Vom V-MVA wurden zusätzliche 2 ml 30 min im Wasserbad behandelt.

UV-Licht:

Die Bestrahlungen wurden unter einem UV-Brenner (Philips, 30 Watt) einer Laminar-Flow-Sicherheitsbank vorgenommen. Proben von 3 ml wurden in offenen Petrischälchen (5 cm Durchmesser) auf einem Magnetrührer aus einem Abstand von 28 cm 2 min unter ständigem Rühren bestrahlt (BRODOROTTI und MAHNEL, 1981).

Säure:

Proben der Virussuspensionen von 3 ml wurden durch Zugabe von 0,1 N HCl auf den pH-Wert 3 unter Vorkontrolle mit pH-Indikatorstäbchen und anschließender genauer Messung mit einem

Digital-pH-Meter eingestellt.

Nach 30 min Einwirkungszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben rasch mit 0,1 N NaOH auf pH 7 zurücktitriert und auf Eis gelagert.

Lauge:

1 N NaOH wurde jeder Virusprobe von 2 ml im Verhältnis auf eine Endkonzentration von 0,2% zugesetzt. Nach 20 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurden die Suspensionen mit 0,1 N HCl neutralisiert und auf Eis gelagert.

Formalin:

Virusproben von 3 ml wurden mit Formalin (35%ige Formaldehydlösung nach DAB7) in der Endkonzentration 0,5%, 30 min bei Raumtemperatur behandelt.

β -Propiolakton:

3,4 ml jeder Virussuspension wurden zunächst mit 1 N NaOH auf den pH-Wert 8,4 eingestellt und β -Propiolakton ($C_3H_4O_2$ reinst; Fa. Serva, Heidelberg) in einer 1:10-Verdünnung mit Aqua dest. zur Endkonzentration von 0,06% zugesetzt. Die Inaktivierung erfolgte über 30 min bei 4°C und anschließender 3 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler unter laufender pH-Überwachung und Korrektur mit 1 N NaOH auf pH 7,4. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C wurde ein weißer Bodensatz 15 min bei 1500 UpM abzentrifugiert und der Überstand im Kühlschrank gelagert. 2 ml jedes Virusstammes wurden als Kontrollen (PBS-Zugabe anstelle des β -Propiolaktone) analog zu den Reaktionsgemischen behandelt.

Alle inaktivierten Virussuspensionen wurden im Anschluß an die jeweilige Inaktivierung im Mikrotitersystem in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-5} auf ihren Restvirusgehalt geprüft sowie im ELISA untersucht. Die β -Propiolakton-Kontrolle wurde in den herkömmlichen Verdünnungsschritten (10^{-1} - 10^{-11}) titriert.

3.3 Versuche und Ergebnisse

3.3.1 Die quantitativen Untersuchungen an Orthopockenvirus-Suspensionen im Überblick

18 OPV-Stämme, als Kulturvirussuspensionen konserviert, wurden nach der Endverdünnungsmethode im Mikrotitersystem, nach der Plaquezählmethode, in drei unterschiedlichen ELISAs und durch die Partikelzählung im EM ausgewertet. Die Ergebnisse, in KID_{50} , PBE und PZ pro ml errechnet, sind in der Tabelle 3 aufgelistet. Die in den ELISAs gewonnenen Werte sind in späteren Abschnitten dargelegt. Ihre Auswertung und die Darstellung der Beziehungen zwischen den Ergebnissen der einzelnen quantitativen Meßmethoden werden in den anschließenden Kapiteln vorgenommen.

Der Gesamtüberblick anhand der einzelnen Vergleiche wird durch die Umrechnung der Meßwerte in logarithmische, auf eine Komma-stelle gerundete Zahlen ermöglicht.

Tabelle 3: Ergebnisse der Infektiositätsmessungen und der Partikelzählungen im EM.
Alle Angaben bezogen auf 1 ml.

Virusstamm	Virusgehalt nach			Partikel-	
	Endverdünnung KID ₅₀ (log10)	Plaquezählung		zahl im EM	
		PBE	log 10	PZ	log10
1. V-MVA	8,2			2,9x10 ⁸	8,5
2. V-E	7,6	2,1x10 ⁷	7,3	7,5x10 ⁸	8,9
3. V-R325	6,3	1,2x10 ⁶	6,1	7,1x10 ⁷	7,9
4. V-IHD	6,6	3,5x10 ⁶	6,6	1,2x10 ⁸	8,1
5. V-Bern	6,8	7,5x10 ⁶	6,9	3,2x10 ⁸	8,5
6. N.V-Lev.	6,2	2,0x10 ⁵	5,3	8,9x10 ⁷	8,0
7. N.V-M1	7,6	3,7x10 ⁶	6,6	6,1x10 ⁸	8,8
8. N.V-Hagen	7,9	1,6x10 ⁷	7,2	2,4x10 ⁹	9,4
9. V-TT	7,3	2,6x10 ⁶	6,4	4,3x10 ⁸	8,6
10. RPV	7,3	2,3x10 ⁶	6,4	4,0x10 ⁸	8,6
11. APV	8,3	1,1x10 ⁷	7,0	1,1x10 ⁹	9,0
12. MPV	6,3	2,1x10 ⁶	6,3	3,0x10 ⁸	8,5
13. KR-2	6,4	7,8x10 ⁵	5,9	1,4x10 ⁸	8,2
14. KR-58	6,2	2,2x10 ⁵	5,3	1,2x10 ⁸	8,1
15. BPV	7,1	6,8x10 ⁵	5,8	5,0x10 ⁸	8,7
16. EPV	5,2	1,5x10 ⁵	5,2	1,3x10 ⁸	8,1
17. CPV	4,9	2,5x10 ⁴	4,4	1,1x10 ⁸	8,1
18. OPV-85	4,9	3,2x10 ⁴	4,5	6,0x10 ⁷	7,8

3.3.2 Vergleich der Infektiosität nach Auswertung in Endverdünnungs- und Plaquezählmethode

Der Gehalt an infektiösem Virus in den 18 Suspensionen wurde vergleichend mittels Titrierung in Zellkulturen auf zwei verschiedenen Wegen gemessen:

- Mit der Endverdünnungs- oder quantitativen Methode (BONIN, 1973), hier im Mikrotitersystem, wird mit Hilfe geometrischer Verdünnungsreihen, verimpft auf empfängliche Zellkulturen, die Grenzverdünnungsstufe ermittelt, in welcher noch 50% der Reagenten (Kulturen) positiv sind bzw. cpE ausbilden. Die Berechnung der Titer in KID_{50} pro Volumeneinheit erfolgt anschließend nach SPAERMAN und KAERBER (1931). Durch die Rückrechnung wird ein mittlerer Vergleichswert (50%-Dosis) der infektiösen Viruseinheiten, bezogen auf das Nachweissystem, in der Virussuspension pro Volumeneinheit festgelegt.

Die mittlere infektiöse Dosis ist somit ein rechnerisch ermittelter Näherungs- oder Schätzwert, der bei Zellkulturen die Dosis angibt, welche bei entsprechender Verdünnung die Hälfte der Reagenten infiziert.

- In der Auszählungs- oder quantitativen Methode wird direkt die Zahl infektiöser Einzeleffekte (Plaques) in der Zellkultur, ausgelöst durch Verimpfung einer bestimmten Virusverdünnungsstufe, gezählt, die Anzahl der "plaquebildenden Einheiten (PBE)" einer Verdünnungsstufe festgelegt und schließlich auf den Gehalt in der unverdünnten Suspension pro Volumeneinheit hochgerechnet.

In der folgenden Tabelle 4 werden die Ergebnisse aus beiden Meßverfahren aufgelistet.

Von den 18 OPV-Stämmen sind die ersten 9 VV-Stämme. Vermerkt ist jeweils die Zellart, mit der nach beiden Titriermethoden bei den einzelnen Virusarten der Nachweis geführt wurde. Die

im Mikrotiterverfahren verwendeten Kulturzellen waren mit denen identisch, in denen der jeweilige OPV-Stamm zuvor gezüchtet worden war. Die meisten Virusstämme hatten in diesen Zellkulturen mehrere Passagen durchlaufen. Für den Plaquetest wurden, ausgenommen die L929- und BEL-Zellen, einheitlich MA-Zellen verwendet, die nur teilweise identisch mit dem ursprünglichen Vermehrungssystem waren.

Tabelle 4: Infektiosität in Zellkulturen pro ml, ermittelt nach 2 Meßmethoden, im Vergleich.

Virusstamm	KID ₅₀ Zell- (log10) art	PBE Zell- (log10) art	Differenz		Quotient x _i	Streuung x _i -x ₀ (x ₀ =1)
			KID ₅₀ -PBE (log10)			
1. V-MVA	8,2	HEF	n.d.		-	-
2. V-E	7,6	HeLa	7,3	MA	0,3	1,0
3. V-R325	6,3	MA	6,1	MA	0,2	0,6
4. V-IHD	6,6	MA	6,6	MA	0	0
5. V-Bern	6,8	HEF	6,9	MA	-0,1	-0,2
6. N.V-Lev.	6,2	BEL	5,3	MA	0,9	6,9
7. N.V-M1	7,6	MA	6,6	MA	1,0	9,0
8. N.V-Hagen	7,9	MA	7,2	MA	0,7	4,0
9. V-TT	7,3	MA	6,4	MA	0,9	6,9
10. MPV	6,3	HEF	6,3	L929	0	0
11. EPV	5,2	BEL	5,2	MA	0	0
12. OPV-85	4,9	BEL	4,5	MA	0,4	1,5
13. CPV	4,9	BEL	4,4	BEL	0,5	2,2
14. KR-2	6,4	BEL	5,9	MA	0,5	2,2
15. KR-58	6,2	RK	5,3	MA	0,9	6,9
16. RPV	7,3	BEL	6,4	MA	0,9	6,9
17. APV	8,3	MA	7,0	MA	1,3	19,0
18. BPV	7,1	BEL	5,8	MA	1,3	19,0

n.d. = nicht durchführbar

Die KID₅₀-Werte aller OPV liegen zwischen $10^{6,3}$ (APV) bzw. $10^{6,2}$ (V-MVA) und $10^{5,2}$ (EPV) bzw. $10^{4,9}$ (CPV und OPV-85) mit den niedrigsten Werten. Für alle VV, die RPV, APV, MPV, KR-2 und KR-58 errechnen sich nach der Endverdünnungsmethode Titer über $10^{6,2}$.

Die Endablesung der Titrierungen auf den Mikrotestplatten erfolgte einheitlich nach 7 Tagen. Während dieses Beobachtungszeitraumes wurde festgehalten, daß der cpE bei allen VV, den RPV und APV in den Zellkulturen früher eintrat als bei KR-2, KR-58 und MPV. Die längste Zeit zur Ausbildung des cpE benötigten BPV sowie EPV, CPV und OPV-85, die mit Abstand den schwächsten Gehalt an kulturinfektiösem Virus aufweisen.

Die Auswertungen der Plaquezählmethode erfolgten nach standardisierten Bedingungen nach 2 Tagen, um die Streuung zu Sekundärplaques zu vermeiden. Zu diesem Zeitpunkt waren bei den unterschiedlichen OPV-Stämmen die Einzelplaques, je nach Vermehrungstempo des Virus (vgl. oben), z.T. nur unvollständig ausgebildet. Die nach der Ablesung errechneten PBE/ml liegen zwischen $10^{7,2}$ (V-Hagen) und $10^{4,4}$ (CPV).

Analog der Ergebnisse aus der Endverdünnungsmethode repräsentieren auch bei diesem Meßverfahren alle VV (außer das N.V.-Lev.), das RPV und das MPV höhere ($PBE > 10^{6,1}$), dagegen das EPV, OPV-58 und CPV wieder die niedrigsten Werte ($PBE < 10^{5,2}$). KR-2 und KR-58, das BPV und das N.V.-Lev. stehen zwischen den beiden Randgruppen.

Eine Zählung von "Plaques" zur Berechnung der PBE für V-MVA war aufgrund des späten cytociden Effektes des stark attenuierten Stammes nicht möglich.

Ein Vergleich der Auswertungsergebnisse aus beiden Meßmethoden hat zwei Faktoren zu berücksichtigen. Einmal liegt die biometrische Signifikanz bei der benützten Endverdünnungstechnik bei $0,7 \log 10$ bzw. bei der Plaqueauswertung bei $0,3 \log 10$. Differenzen in dieser Größe sind somit methodisch möglich. Zweitens wird ein 50%-Wert, die Dosis welche 50% der Reagenten infiziert, mit der Dosis verglichen, die stets noch 1 Plaque erzeugt (100%-Wert). In der Summe dürfen Unterschiede bis $1 \log 10$ deshalb nicht als beweisend gewertet werden. Unter die-

sem Aspekt spricht nur die Bewertung bei APV und BPV für die Endverdünnungsmethode.

Zur deutlicheren Differenzierung zwischen KID_{50} und PBE wird in der Tabelle 4 für jeden Virusstamm das Verhältnis KID_{50} zu PBE gebildet und die Streuung vom Verhältnis $x_0=1$, der die Abweichungen der PBE von der KID_{50} wiedergibt, berechnet. Für V-Bern muß sich eine negative Beziehung ergeben, da in diesem Fall der Wert der PBE größer ist als jener der KID_{50} . Für die ersten 3 VV-Stämme (Tabelle 4) und die ersten 5 tierspezifischen OPV der unteren Rubrik sind die Werte aus beiden Infektiositätsmessungen teilweise identisch (beim V-IHD, MPV und EPV), zum Teil variieren sie innerhalb kleiner Grenzen. Dagegen weichen die Neuro-VV einschließlich der Virusrekombinante V-TT auf das 4 - 9 fache gegenüber den übrigen VV ab. Ähnlich streuen die Werte bei RPV und KR-58. Große Abweichungen der Ergebnisse aus den beiden Meßmethoden ergeben sich für APV und BPV.

Tabelle 5 vermittelt einen Überblick über die Streuungsparameter zwischen beiden Meßmethoden in 3 Gruppierungen, die sich aus den Einzelabweichungen der 18 OPV ableiten lassen. Es wurden die Standardabweichung s und die durchschnittliche Abweichung d sowie die Durchschnittswerte der Abweichungen für alle 17 OPV gemeinsam berechnet und sie den Streuungsmaßen der VV-Gruppe (Nr. 2-9 der Tabelle 4) sowie der tierspezifischen OPV-Gruppe (Nr. 10-18 der Tabelle 4) gegenübergestellt.

Tabelle 5: Virusgruppenbezogene Abweichungen zwischen den beiden Infektiositätsmeßwerten KID₅₀ und PBE.

Virusgruppe	OPV		VV		OPV-VV tierspez.	
	absol. Wert	log 10	absol. Wert	log 10	absol. Wert	log 10
Standardab- weichung s von $x_0=1$	7,8	0,9	4,9	0,7	9,6	1,0
durchschnittliche Abweichung d von $x_0=1$	5,1	0,7	3,5	0,5	6,4	0,8
Durchschnitts- wert D der Ab- weichungen	6,1	0,8	4,5	0,7	7,4	0,9

Das Streuungsmaß s bedeutet, daß die KID₅₀ für die Gesamtheit aller OPV bis zum 7,8 fachen (bzw. bis um den Faktor $10^{0,9}$) größer sein kann als die PBE. Die KID₅₀ der VV kann bis um das 4,9 fache (bzw. bis um den Faktor $10^{0,7}$) der PBE variieren und liegt damit innerhalb einer geringeren Schwankungsbreite als die KID₅₀ stellvertretend für alle OPV. Dagegen kann die KID₅₀ der restlichen OPV Werte bis um das 10 fache (10^1) der PBE einnehmen, die die Standardabweichung der gesamten Virusgruppe übertreffen.

Die durchschnittliche Streuung jeder Gruppierung der Stämme bestätigt die Abstufungen der Standardabweichungen. Die Bildung von Durchschnittswerten für die Abweichungen der einzelnen Virusgruppierungen ergibt, daß die KID₅₀ aller OPV um den Faktor $10^{0,8}$ höher sind als die PBE. Die KID₅₀ der VV sind dagegen im Mittel nur um $10^{0,7}$, die der tierartspezifischen

schen OPV allerdings um $10^{0.9}$ höher als ihre entsprechenden PBE. Insgesamt liegt dies jedoch noch im Signifikanzbereich.

Aus der Gegenüberstellung der beiden Meßmethoden für die Kulturinfektiosität der 18 OPV-Stämme muß gefolgert werden, daß sich die KID_{50} -Werte, gewonnen aus der Titrierung nach der Endverdünnungsmethode, für alle späteren Vergleiche mit den quantitativen Auswertungen in EM und ELISA aufgrund der größeren Einheitlichkeit des 50%-Wertes besser eignen.

3.3.3 Beziehungen zwischen der Infektiosität und den im EM gezählten Viruspartikeln

Darstellung im EM von Latex- und Viruspartikeln

Die Auszählung der physikalischen Viruspartikel im EM erfolgte, wie bei allen anderen Nachweisverfahren, an Virussuspensionen aus Zellkulturen. Abbildung 1 ist eine elektronenoptische Aufnahme eines dieser Latex-Virus-Gemische.

Abbildung 1: Latex- (→) und OPV-Partikel (→▷) im elektronenmikroskopischen Bild



Die gleichmäßig elektronendichten Latexteilchen, als morphologische Referenzeinheiten, heben sich deutlich durch ihre kugelige bis ovale Gestalt mit glatter Oberfläche und scharfer Umrandung von den Viren ab. Die durch die Präparation i.d.R. geringfügig geschrumpften Viruspartikel dagegen erscheinen als quaderförmige bis ovale, backsteinförmige Gebilde. Es wurden bei der Auszählung alle morphologisch komplett dargestellten Pockenpartikel berücksichtigt.

Relationen zwischen infektiösen Einheiten und Partikelzahlen

Tabelle 6 enthält in Spalte 2 die pro ml hochgerechneten Partikelzahlen (PZ) aus dem elektronenoptischen Zählverfahren aller 18 OPV-Stämme. Diesen Werten sind in der Tabelle die Verhältnisse aus den Titrierungen der Infektiosität (vgl. 3.3.2; Tabelle 4) gegenübergestellt. Die Dividenden stellen die Zahl der physikalischen Partikel dar, die sich für eine KID_{50} - bzw. PBE-Einheit errechnen. Die zwei Verfahren zur Bestimmung des Gehalts an infektiösen Virus in den Virussuspensionen und die Ergebnisse wurden im Abschnitt 3.3.2 dargelegt. In Anlehnung an die im älteren Schrifttum zitierte Beziehung $PZ:PBE$, die als sogenannte "Plaque efficiency (PE)" die relative Plaquebildungsfähigkeit der im EM gezählten physikalischen Partikel beschreibt, werden in der Tabelle 6 zusätzlich die Verhältnismerte $PZ:KD_{50}$ bei den 18 OPV errechnet und im folgenden als "Infektiöse Effizienz oder Infektiöser Wirkungsgrad der Virusteilchen (IE)" aufgeführt. Ebenso wird die im Schrifttum verwendete, auf die PBE bezogene Einheit "Quality (Q)" ($= PBE \times 1000 : PZ$) in Beziehung auch zur KID_{50} gesetzt und mit Q' ($= KID_{50} \times 1000 : PZ$) deklariert. Q bzw. Q' geben die sog. "Virusqualität", den Anteil ($= \text{‰‰}$) der infektiösen Einheiten an der Gesamtheit der Viruspartikel an.

Tabelle 6: Partikelzahlen (PZ) und ihre Beziehungen zur Infektiosität.

Alle Werte beziehen sich auf 1 ml

Virusstamm	PZ	PZ:KID ₅₀ =IE		KID ₅₀ ×1000	PZ:PBE=PE		PBE×1000
	log 10	log 10	absolut	PZ = Q'	log 10	absolut	PZ = Q
1. V-MVA	8,5	0,3	2	500,0	---	---	---
2. APV	9,0	0,7	5	200,0	2,0	100	10,0
3. N.V-M1	8,8	1,2	16	62,5	2,2	159	6,3
4. V-E	8,9	1,3	20	50,0	1,6	40	25,0
5. V-TT	8,6	1,3	20	50,0	2,2	159	6,3
6. RPV	8,6	1,3	20	50,0	2,2	159	6,3
7. V-IHD	8,1	1,5	32	31,3	1,5	32	31,3
8. V-Hagen	9,4	1,5	32	31,3	2,2	159	6,3
9. V-R325	7,9	1,6	40	25,0	1,8	63	15,9
10. BPV	8,7	1,6	40	25,0	2,9	794	1,3
11. V-Bern	8,5	1,7	50	20,0	1,6	40	25,0
12. N.V-Lev.	8,0	1,8	63	15,9	2,7	501	2,0
13. KR-2	8,2	1,8	63	15,9	2,3	200	5,0
14. KR-58	8,1	1,9	79	12,7	2,8	631	1,6
15. MPV	8,5	2,2	159	6,3	2,2	159	6,3
16. EPV	8,1	2,9	794	1,3	2,9	794	1,3
17. OPV-85	7,8	2,9	794	1,3	3,3	1995	0,5
18. CPV	8,1	3,2	1585	0,6	3,7	5012	0,2

IE = "Infektiöse Effizienz"

Q, Q' = "Quality"

PE = Plaque efficiency

Die in den 18 OPV-Suspensionen im EM gezählten und hochgerechneten Partikelzahlen differieren untereinander weniger als ursprünglich vermutet. Die Anzahl der physikalischen Viruspartikel liegt zwischen $10^{9,4}$ bei V-Hagen und $10^{7,8}$ bei OPV-85. Über die "Häufigkeitsverteilung" läßt sich darstellen, wie oft sich die PZ bei den OPV-Stämmen wiederholen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vorkommenshäufigkeit der Partikelzahlen (PZ) bei den 18 OPV-Stämmen

PZ (log 10)	x_i	$\frac{x_i}{x}$
7,8	1	0,06
7,9	1	0,06
8,0	1	0,06
8,1	4	0,22
8,2	1	0,06
8,5	3	0,17
8,6	2	0,11
8,7	1	0,06
8,8	1	0,06
8,9	1	0,06
9,0	1	0,06
9,4	1	0,06
Σ	18	$1,04 \approx 1$

x_i = Anzahl der Virusstämme mit einer bestimmten PZ

x = Gesamtheit der Virusstämme (=18)

$\frac{x_i}{x}$ = Anteil der x_i an der Gesamtheit der Virusstämme (=relative Häufigkeit, mit der die x_i auftreten)

Aus der Tabelle 7 wird deutlich, daß der Schwerpunkt der Verteilung zwischen $10^{8,1}$ und $10^{8,6}$ liegt. Über die Hälfte (56%) der Virusstämme hat eine Partikelzahl innerhalb dieses Bereiches. Dies läßt erkennen, daß alle OPV-Kulturvirussuspensionen eine relativ einheitliche PZ aufweisen, die in der Darstellung der Beziehung zu den infektiösen Einheiten (in KID₅₀ oder PBE) in Quotienten den vergleichsweise wenig variierenden Zähler bildet, die Infektiosität der Virussuspensionen somit den größeren Einfluß hat.

Im Abschnitt 3.3.2 wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Endverdünnungsmethode (KID₅₀) bessere Vergleichswerte bezüglich der Infektiosität liefert als die Plaquezählmethode (PBE). Mittels der Streuungsparameter läßt sich dies quantitativ darstellen. Die PBE-bezogenen Werte, die das Verhältnis zur Partikelzahl ausdrücken (PE), ergeben folglich auch höhere Durchschnittswerte und eine höhere Standardabweichung als die KID₅₀-bezogenen Verhältniszahlen (IE). Der Durchschnittswert aller PE kann mit 647, die Standardabweichung mit 1190 beziffert werden gegenüber dem arithmetischen Mittel der IE mit 212 und einer Streuung um diesen Wert mit 460. Die Rangfolge der 18 OPV-Virusstämme ist deshalb in Tabelle 6 nach der KID₅₀-bezogenen Partikelkennzahl IE erstellt.

Das Verhältnis von PZ zu KID₅₀ gibt an, wieviele Viruspartikel insgesamt auf eine KID₅₀ entfallen. Q stellt dagegen den reziproken Wert dieser Beziehung dar und kennzeichnet den Anteil der kulturinfektiösen Viren (in ‰) an der Gesamtpartikelzahl.

Die niedrigen IE-Werte bei MVA (2) und APV (5) dokumentieren die geringe Differenz zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Viruspartikeln, daß also in diesen Virussuspensionen ein erheblicher Virusanteil infektiös ist. Demgegenüber steht ein großes Meßverhältnis zwischen PZ und KID₅₀ bei den drei untersten Virusstämmen der Tabelle 6 (IE = 794 und 1585). In den Suspensionen von EPV, OPV-85 und CFV sind trotz einer wenig differierender Partikelanzahl nur sehr wenige Virusteilchen infektionstüchtig. 67% der Virusstämme liegen im IE im Mittelbereich mit Partikel-Infektiositäts-Verhältnissen von theo-

retisch 15 (16-1) bis 78 biologisch inaktiven auf ein infektiöses Viruspartikel bzw. auf eine KID₅₀-Einheit.

Mit den IE-Werten der Tabelle 6 lassen sich folgende Gruppierungen bilden:

Gruppe I	mit $1 < IE < 10$	OPV-Stämme: V-MVA, APV;
Gruppe II	mit $10 < IE < 100$	OPV-Stämme: übrige VV, RPV, BPV und KPV;
Gruppe III	mit $100 < IE < 500$	OPV-Stämme: MPV;
Gruppe IV	mit $500 < IE < 1000$	OPV-Stämme: EPV, OPV-85;
Gruppe V	mit $IE > 1000$	OPV-Stämme: CPV.

Zur Charakterisierung und zum Vergleich dieser Gruppierungen können Standardabweichungen s und Durchschnittswerte der IE errechnet werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Standardabweichungen und Durchschnittswerte verschiedener IE-Gruppen im Vergleich

Virusgruppe	VV	I+II	I+II+III	alle OPV
Streuungsmaße				
Standardabweichung s von $IE_0=1$	34	40	56	460
Durchschnittswerte D aller IE	31	34	43	212

Am kleinsten sind sowohl der Mittelwert der IE als auch die Abweichung bei den VV-Stämmen. Auf 1 KID₅₀ kommen in den VV-Suspensionen theoretisch im Mittel 30 (31-1) maximal bis 34 nicht infektiöse Partikel. In den anderen Gruppen liegt der Anteil der inaktiven Partikel pro infektiöser Einheit nur wenig höher. Insgesamt, bezogen auf alle 18 verglichenen OPV-Stämme, sind die Differenzen zwischen PZ und infektiöser Einheit aber mit 212 und 460 IE wesentlich größer als innerhalb der Gruppen.

3.3.4 Quantitative Vergleiche mit dem ELISA

Die 18 OPV-Kulturvirus suspensionen wurden im ELISA gegen drei verschiedene Antikörpersysteme (als "Antigenfänger") getestet:

- I. gegen anti-V-MVA-Kaninchenimmunserum (polyklonale AK),
- II. gegen anti-V-MVA-MAK (monoklonal 5B4/2F2),
- III. gegen anti-V-M1-MAK (monoklonal 1B3/A11).

Alle drei Antikörperarten neutralisieren OPV im Plaquereduktionstest. Die beiden MAK besitzen jedoch keine hämagglutinationshemmende Aktivität und sind spezifisch gegen Hüllproteine der Pockenpartikel gerichtet.

In der Tabelle 9 werden zunächst die OPV-Stämme nach der Höhe ihrer ELISA-Titer und nach ihrer Reaktion in den drei ELISAs eingeordnet. Die Differenzen in den Titerstufen (untere Tabellenhälfte) sind dadurch bedingt, daß in ELISA I und II von einer Vorverdünnung 1:5, im ELISA III von unverdünnten Virussuspensionen ausgegangen und in log 2-Stufen weiterverdünnt wurde.

Tabelle 9: Reaktion der OPV-Stämme im ELISA gegen 3 verschiedene Antikörperarten.

Titer der unverdünnten Virussuspensionen

Einordnung der Stämme in die ELISAs			
Titer im ELISA	1:5 vorverdünnt gegen polyklonale V-MVA-AK	1:5 vorverdünnt gegen V-MVA-MAK	unverdünnt gegen N.V-M1-MAK
5120	V-MVA; V-Bern		
2560	V-IHD; N.V-Hagen V-TT; RPV	V-MVA; N.V-M1 V-TT; RPV; KR-58	
1280	V-E; V-R325 N.V-M1; BPV	V-E; V-Bern N.V-Hagen	
640	N.V-Lev. MPV; KR-58	V-R315; V-IHD	
320	APV; EPV	N.V-Lev.; EPV KR-2; BPV	
160	CPV; OPV-85	CPV; OPV-85	
128			N.V-Hagen
80	KR-2		
32			N.V-M1; V-MVA V-IHD; V-TT V-Bern
16			V-E; RPV
10		APV; MPV	
8			V-R325 N.V-Lev.; APV
4			BPV
2			MPV

Das anti-V-MVA-Immunserum bindet alle OPV-Stämme, aber in unterschiedlicher Intensität. Die besten Titer erzielen das homologe V-MVA (100%-Wert) und V-Bern, bei 60% der Stämme liegen die Titer zwischen 1:640 und 1:2560, schwächer reagieren APV, EPV, CPV und OPV-85, und eine Ausnahme bildet KR-2.

Die monoklonalen anti-V-MVA-AK reagieren mit den 18 Stämmen ebenfalls unterschiedlich intensiv, aber relativ einheitlich, ausgenommen APV und MPV. Richtwert für die Reaktivität (100%-Wert) ist hier wiederum V-MVA als homologer Stamm. Die beiden KPV (KR58, KR-2) lassen sich mit monoklonalen anti-V-MVA-AK besser erfassen als mit dem anti-V-MVA-Immunserum.

Als nicht geeignet für weitere Vergleiche erweist sich der ELISA mit den anti-V-M1-MAK. Mangelnde Bindung, erkennbar in schwachen ELISA-Extinktionen, und die negative Reaktion (Nicht-Erkennung) mit KR-2, KR-58, EPV, CPV und OPV-85 in unverdünnter Zugabe weisen darauf hin, daß dieser MAK neben schwacher Avidität zu speziell gegen bestimmte Epitope von V-M1 gerichtet ist.

In der Tabelle 10 und Abbildung 2 sind die im **polyklonalen** ELISA-System (gegen V-MVA-AK) erzielten Titer den im Elektronenmikroskop ermittelten Partikelzahlen einerseits und den Infektiositäts-Werten (KID_{50}) der Virussuspensionen andererseits gegenübergestellt.

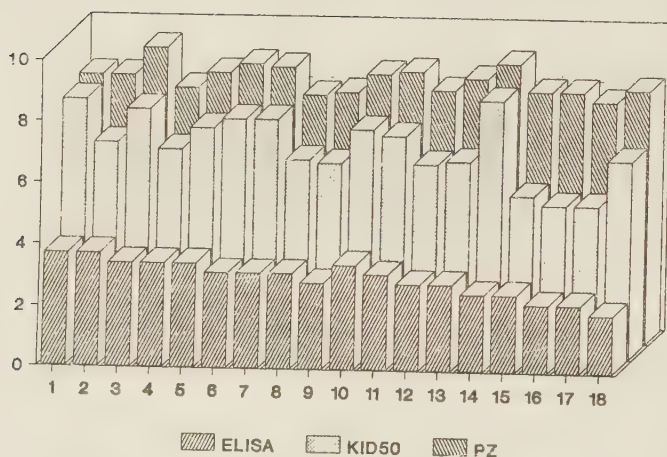
Bei der Auswertung der Parameter muß daran erinnert werden, daß bei den Werten aller drei Spalten immer die durch die jeweiligen Meßmethoden bedingten Streuungen der Einzelwerte berücksichtigt werden müssen. So gelten in der ELISA-Titrierung eine 4-fache ($2 \log 2$ -Stufen), bei Partikelzahlen und KID_{50} -Werten nur Differenzen ab $0,7 \log 10$ als signifikant.

Tabelle 10: Vergleich der ELISA-Reaktionen gegen **polyklonale** anti-V-MVA-Antikörper mit den Partikelzahlen und KID₅₀-Werten der Virussuspensionen

OPV-Stamm		PZ/ml (log 10)	anti-V-MVA- Immunserum Titer ELISA 1:	KID ₅₀ /ml (log 10)
I	V-MVA	8,5	5120	8,2
	V-Bern	8,5	5120	6,8
	N.V-Hagen	9,4	2560	7,9
	V-IHD	8,1	2560	6,6
	V-TT	8,6	2560	7,3
	V-E	8,9	1280	7,6
	N.V-M1	8,8	1280	7,6
	V-R325	7,9	1280	6,3
	N.V-Lev.	8,0	640	6,2
II	RPV	8,6	2560	7,3
	BPV	8,7	1280	7,1
III	KR-58	8,1	640	6,2
	MPV	8,5	640	6,3
	APV	9,0	320	8,3
	EPV	8,1	320	5,2
	CPV	8,1	160	4,9
	OPV-85	7,8	160	4,9
	KR-2	8,2	80	6,4

Abbildung 2:

Vergleich der ELISA-Reaktionen gegen
polyklonale anti V-MVA-Antikörper mit den
Partikelzahlen und KID 50-Werten der
Virussuspensionen



I

- 1 V-MVA
- 2 V-Bern
- 3 N.V-Hagen
- 4 V-IHD
- 5 V-TT
- 6 V-E
- 7 N.V-M1
- 8 V-R325
- 9 N.V-Lev.

II

- 10 RPV
- 11 BPV

III

- 12 KR-58
- 13 MPV
- 14 APV
- 15 EPV
- 16 CPV
- 17 OPV-85
- 18 KR-2

Zum Überblick darf der Tabellenvergleich in die Rubriken I, II und III untergliedert werden.

In Rubrik I, die alle VV-Stämme enthält und innerhalb der ein allgemein serologisch sehr enger Bezug zum homologen V-MVA-Stamm anzunehmen ist, deutet sich ein wesentlich engerer Bezug der ELISA-Bindung zu den Partikelkonzentrationen an als zur Infektiosität. Ausnahmen bilden nur N.V.-Lev. und V-R325. Auch die in Rubrik II geordneten OPV-Stämme RPV und BPV, serologisch den VV sehr eng verbunden, sprechen viel eher für einen Bezug zur Partikelzahl. Hohe ELISA-Titer resultieren trotz signifikant - gegenüber V-MVA - niedrigeren KID₅₀-Werten. Die Reaktionen im ELISA der OPV-Stämme in Rubrik III müssen in ihrer Beziehung zum AK, somit auch im Vergleich, anders bewertet werden. Im Verhältnis zur durchgehend vergleichbar hohen Partikelzahl fallen die ELISA-Titer deutlich ab. Es scheint eher eine Beziehung zu den gegenüber Rubrik I und II schwächeren KID₅₀-Werten vorzuliegen. Am Exempel von APV wird aber deutlich, daß die niedrigeren ELISA-Titer der OPV-Stämme dieser Rubrik nicht letztgenannten Bezug, sondern eine schwächere serologische Kreuzbeziehung zum heterologen anti-V-MVA-Immunsérum ausdrücken.

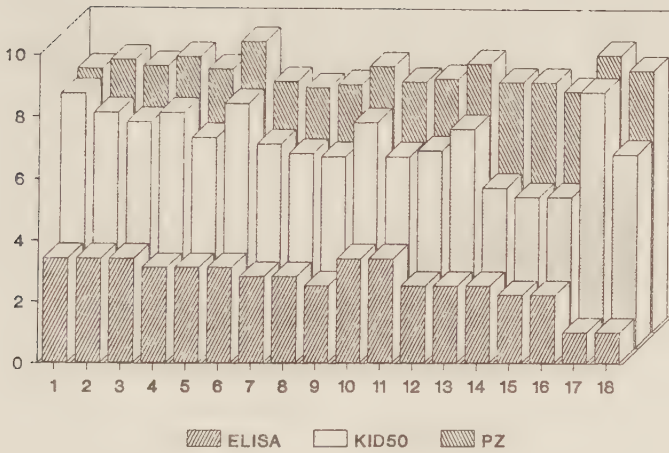
In der Tabelle 11 und Abbildung 3 sind die ELISA-Ergebnisse der OPV-Stämme im Test gegen **monoklonale** anti-V-MVA-AK den Partikelzahlen und KID₅₀-Werten, gleichartig wie in Tabelle 10, gegenübergestellt und wiederum drei Rubriken markiert. Auch hier gelten bei der vergleichenden Auswertung die zuvor genannten Einschränkungen durch die Signifikanzen.

Tabelle 11: Vergleich der ELISA-Reaktionen gegen **monoklonale** anti-V-MVA-Antikörper mit den Partikelzahlen und KID₅₀-Werten der Virussuspensionen

OPV-Stamm		PZ/ml (log 10)	V-MVA-MAK Titer im ELISA 1:	KID ₅₀ /ml (log 10)
I	V-MVA	8,5	2560	8,2
	N.V-M1	8,8	2560	7,6
	V-TT	8,6	2560	7,3
	V-E	8,9	1280	7,6
	V-Bern	8,5	1280	6,8
	N.V-Hagen	9,4	1280	7,9
	V-IHD	8,1	640	6,6
	V-R325	7,9	640	6,3
	N.V-Lev.	8,0	320	6,2
II	RPV	8,6	2560	7,3
	KR-58	8,1	2560	6,2
III	KR-2	8,2	320	6,4
	BPV	8,7	320	7,1
	EPV	8,1	320	5,2
	CPV	8,1	160	4,9
	OPV-85	7,8	160	4,9
	APV	9,0	10	8,3
	MPV	8,5	10	6,3

Abbildung 3:

Vergleich der ELISA-Reaktionen gegen
monoklonale anti V-MVA-Antikörper mit den
Partikelzahlen und KID 50-Werten der
Virussuspensionen



I

- 1 V-MVA
- 2 N.V-M1
- 3 V-TT
- 4 V-E
- 5 V-Bern
- 6 N.V-Hagen
- 7 V-IHD
- 8 V-R325
- 9 N.V-Lev.

II

- 10 RPV
- 11 KR-58

III

- 12 KR-2
- 13 BPV
- 14 EPV
- 15 CPV
- 16 OPV-85
- 17 APV
- 18 MPV

Die VV-Stämme in den ersten 6 Zeilen der Tabelle reagieren sehr gut im ELISA. Alle weisen PZ über $10^{8,5}$ auf, während die Infektiosität mehr differiert (KID_{50} zwischen $10^{6,8}$ und $10^{8,2}$). Schwächer reagieren 3 weitere VV-Stämme, insbesondere wiederum N.V.-Lev. Diese Stämme jedoch sind auch hinsichtlich Partikelzahl und KID_{50} im Nachteil. Der Vergleich der ELISA-Ergebnisse spricht auch in diesem System mehr für den Bezug zur Partikelzahl als zur Infektiosität.

Letztgenannter Bezug interferiert naturgemäß bei den Nicht-VV-Stämmen (Rubrik III) mit der starken Heterologität des maßgeblichen monoklonalen anti-V-MVA-AK, also mit den sicherlich wesentlich geringeren Epitop-Bindungschancen dieser "fangenden" AK gegenüber so unterschiedlichen heterologen OPV-Stämmen wie BPV, EPV, CPV und OPV-85.

Nur minimal ist die Bindung der an das Ende der Tabelle gesetzten APV und MPV. Dieses - fast als negative Kontrolle verwertbare - Ergebnis bestätigt die zu hohe Spezifität des bindenden anti-V-MVA-MAK trotz hoher Infektiosität (APV) und hoher Partikelzahl (APV und MPV).

Die Vergleiche dieses Abschnittes, bezogen auf die Reaktion der OPV-Suspensionen in zwei ELISA-Systemen, sind im Ergebnis und nur anhand der Vergleichswerte innerhalb der VV-Stämme ausreichend fundiert zusammenfaßbar. Sie erlauben die Aussage, daß eine Bindung im ELISA an einen breiter ausgelegten AK wesentlich mehr mit der Konzentration der viralen Partikel einer Probe korreliert zu sein scheint als mit deren Gehalt an vermehrungsfähigen Viren.

Diese Aussage ließ sich in nachfolgenden Testen untermauern. Proben der Virussuspensionen wurden, wie es in vergleichenden ELISAs vielfach gehandhabt wird, durch Verdünnung auf dem Standard des V-MVA-Stammes einmal auf annähernd gleiche Partikelzahl, ferner auf exakt gleiche KID_{50} -Gehalte eingestellt. Die Beziehungen der resultierenden ELISA-Titer, gegen polyklonale anti-V-MVA-AK einerseits und monoklonale anti-V-MVA-AK andererseits, änderten sich dadurch nur in minimalen Größenordnungen.

3.3.5 Reaktion im ELISA von inaktivierten OPV

Virussuspensionen der drei OPV-Stämme V-MVA, V-E und KR-2 wurden jeweils durch Wärme, UV-Strahlen, Säure, Lauge, Formalin und β -Propiolakton inaktiviert, anschließend die Restinfektiosität ermittelt und die Reaktionsfähigkeit der inaktivierten Proben gegen polyklonale und monoklonale anti-V-MVA-AK im ELISA geprüft. Proben der Ausgangssuspensionen liefen als Kontrolle parallel.

Für jeden Virusstamm wurde ferner eine β -Propiolakton-Kontrolle mitgetestet. Diese Kontrolle durchlief alle bei der Inaktivierung durch β -Propiolakton erforderlichen methodischen Schritte, lediglich wurde anstelle des β -Propiolaktone PBS zugesetzt. In folgender Tabelle 12 sind für die drei Stämme und jede Inaktivierungsmethode die Restinfektiositäten sowie die Ergebnisse aus den zwei ELISAs aufgeführt.

Aus der Tabelle 12 und den Abbildungen 4 und 5 sind die Reaktionen der inaktivierten Virusproben im ELISA im Vergleich zu den unbehandelten Proben ersichtlich. Nur bei Abweichungen der ELISA-Titer um mindestens 2 Verdünnungsstufen sowie bei deutlich verschiedenen Kurvenverläufen kann dies als signifikanter Unterschied gewertet werden.

Tabelle 12: Partikelzahl, Restinfektiosität und ELISA-Titer von inaktivierten Virussuspensionen.
PZ und KID₅₀ in log 10/ml

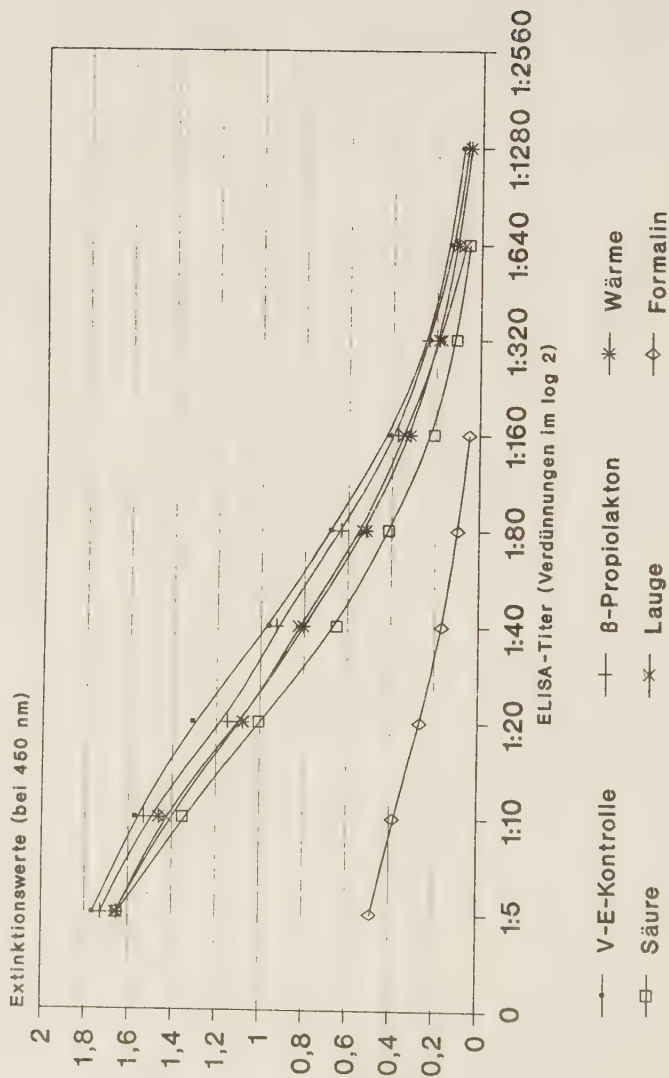
Virusstamm	V-MVA			V-E			KR-2		
	PZ	KID ₅₀	ELISA-Titer 1: mono-klonal Titer 2: poly-klonal	PZ	KID ₅₀	ELISA-Titer 1: mono-klonal Titer 2: poly-klonal	PZ	KID ₅₀	Titer 1: mono-klonal Titer 2: poly-klonal
ELISA-Inaktivierungsmethode									
Kontrolle Virus unbehandelt	8,5	8,2	2560	8,9	7,6	1280	8,2	6,4	320
Kontrolle zu β -Propiolaktone		7,7	1280		7,3	1280		6,1	160
β -Propiolaktone		<1,0	2560		<1,0	1280		<1,0	160
UV-Strahlen		<1,0	1280		2,8	1280		2,7	160
Wärme 20 min		4,4	2560		3,4	640		3,8	80
Wärme 30 min		<1,0	2560			160			10
Säure		<1,0	640		<1,0	640		<1,0	80
Lauge		<1,0	1280		<1,0	640		<1,0	160
Formalin		<2,0	640		<2,0	160		4,6	<5

1) anti-V-MVA-MAK

2) anti-V-MVA-Immunsrum

Alle eingesetzten Mittel inaktivieren die Viren in den drei Suspensionen vollständig oder weitgehendst. Nach der Behandlung mit β -Propiolakton, Säure, Lauge und auch Formalin bleibt keine Restinfektiosität bis zur Nachweisgrenze, die UV-Strahlen erfassen 99,99 - 99,999% des Virus und die Wärmeeinwirkung reduziert den Virusgehalt um durchschnittlich 4 Zehnerpotenzen (99,99%).

Abbildung 4 Monoklonaler ELISA-Titrationsverlauf am
Beispiel des inaktivierten V-E

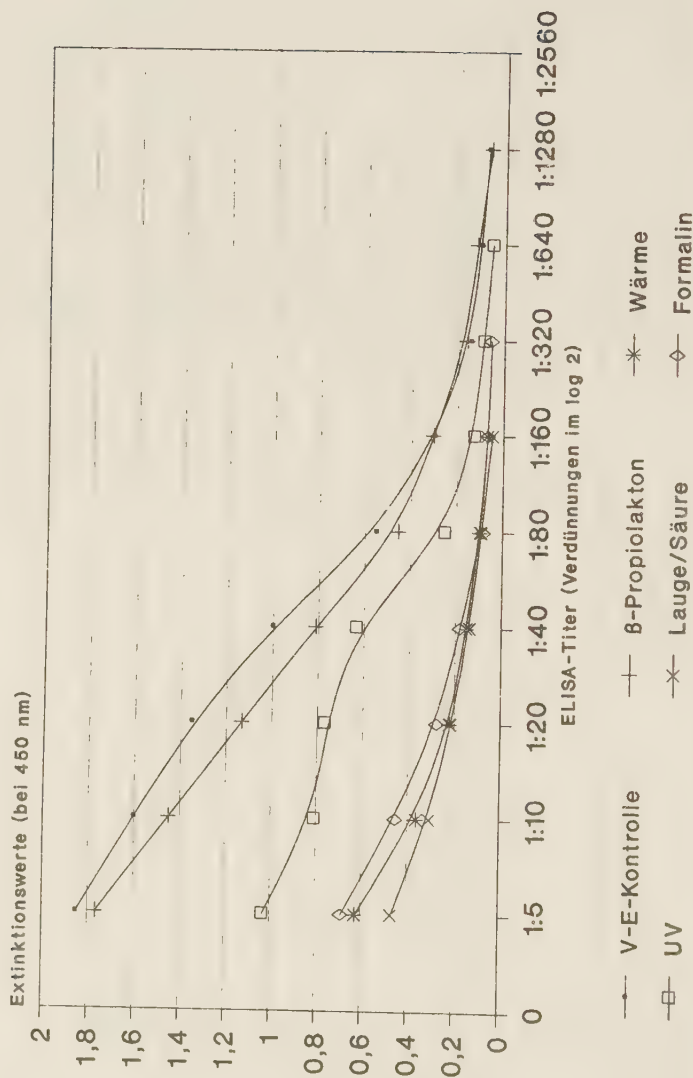


Aufgrund nahezu desselben Kurvenverlaufs wie die Titrationskurve für die V-E-Kontroll suspension wurde auf die Darstellung der β-Propiolakton-Kontrolle sowie der wärmeinaktivierten Virussuspension verzichtet.

In der Reaktion der drei inaktivierten Stämme im ELISA gegen **monoklonale anti-V-MVA-AK** ist ein signifikanter Abfall gegenüber der Kontrolle nur nach der Formalinbehandlung meßbar. Die etwas reduzierten ELISA-Titer nach der Säurebehandlung und z.T. nach der Thermoinaktivierung sind nicht als signifikant zu werten.

Die Ergebnisse aus den ELISAs zeigen zweifelsfrei, daß diese Reaktivität nicht an die Infektiosität der Virussuspensionen gebunden, sondern allein mit dem Gehalt und dem reaktionsfähigen Zustand der Viruspartikel korreliert ist. Die meisten Inaktivierungsmittel reduzieren die Vermehrungsfähigkeit der Viren weitgehendst, nicht aber deren Bindung mit dem MAK. Nur das Formalin dürfte maßgeblich OPV-Epitope soweit schädigen, daß auch die Reaktion mit dem MAK stark beeinträchtigt ist.

Abbildung 5 Polyklonaler ELISA-Titrationsverlauf am
Beispiel des inaktivierten V-E



Aufgrund des fast identischen Kurvenverlaufs wie die Titrationskurve für die V-E-Kontroll suspension wurde auf die Darstellung der β-Propiolakton-Kontrolle verzichtet. Da sich ebenfalls für die säure- und laugeninaktivierten V-E-Suspensionen nahezu dieselben Extinktionswerte ergeben, wurden beide Titrationsverläufe innerhalb eines gemeinsamen Kurvenverlaufes erfaßt.

Im Vergleich zum ELISA mit MAK werden die Reaktionen der Virusproben mit **polyklonalen anti-V-MVA-AK** wesentlich mehr durch die Inaktivierungsmittel beeinträchtigt. Außer bei β -Propiolakton und UV-Strahlen lassen sich die anderen inaktivierten Proben alle signifikant schlechter erfassen, am wenigsten die mit Säure und Lauge behandelten Suspensionen. Auch die Behandlung mit Formalin und Wärme dezimierte die Reaktionsfähigkeit gegen die polyklonalen AK markant. Die Beeinträchtigung wird neben den Titern (Tabelle 12) auch an den Extinktionswerten (Abbildung 3) erkennbar. Hier läßt sich ein Einfluß der Inaktivierung ebenfalls nach der UV-Bestrahlung ablesen. Praktisch keine Veränderungen in der Reaktion bewirkt die Inaktivierung mit β -Propiolakton.

Auch die Ergebnisse aus den ELISAs mit polyklonalen AK weisen somit eindeutig darauf hin, daß die Reaktivität der drei Virusstämme im ELISA nicht an ihre Infektiosität gebunden ist. Eine Korrelation mit der Partikelzahl ist soweit gegeben, als die Viruspartikel in ihren für die Bindung mit polyklonalen-anti-V-MVA-AK maßgeblichen, hier diversen Epitopen nicht oder nicht entscheidend durch chemische und physikalische Einflüsse geschädigt oder verändert sind.

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Neben der Züchtung der Orthopockenviren (OPV) in empfänglichen Zellsystemen, die von vermehrungsfähigen infektionstüchtigen Viruspartikeln abhängt, lassen sich diese Viren heute in Praxis- und Laborproben schnell und zuverlässig auch mittels Elektronenmikroskop (EM) und ELISA erfassen. Aufgabe der hier vorgelegten experimentellen Studie war es, quantitative Beziehungen zwischen den Konzentrationen der infektiösen und der physikalischen Viruspartikel einerseits und der Reaktionsfähigkeit vermehrungsfähiger wie auch inaktiver OPV im ELISA andererseits aufzuzeigen. Erwartet wurden zumindest Teilantworten auf die Fragen, wie die Vor- und Nachteile der Methoden, Züchtung in empfänglichen Zellkulturen mit Erfassen der infektiösen Partikel, Nachweis der Viruspartikel im EM oder Erfassung von Virusantigen generell im ELISA einzuschätzen sind.

Von grundsätzlichem Interesse war ferner die Vermehrungsfähigkeit verschiedener OPV-Stämme in kompetenten Zellen, die Produktivität dieser Zellen bezüglich Infektiosität und evtl. unterschiedliche OPV-spezifische Antigenitäten. Ergebnisse zu diesen Fragen aufgrund vergleichender Untersuchungen sind im älteren Schrifttum nur ganz vereinzelt, in neuerer Literatur nicht zu finden.

Um Quantitäten der obengenannten Qualitäten vergleichen zu können sind geeignete reproduzierbare Meßmethoden erforderlich. Für die Messung der Infektiosität liegen bei OPV jahrzehntealte Erfahrungen vor und auch die Zählung der Viruspartikel im EM kann nach bewährten Verfahren vorgenommen werden. Nur die ELISAs sind Techniken der neueren Zeit und waren spezifisch auf die Eignung für die geplanten Vergleiche an OPV vorab methodisch zu testen.

Im ersten experimentellen Schritt galt es deshalb festzulegen, welches Meß- und Berechnungsverfahren für die Infektiosität der OPV-Suspensionen sich für die geplanten Vergleiche besser eignet. Die Wahl lag zwischen der sog. Endpunktmethode, bei der diejenige Verdünnungsstufe einer Virusprobe für die Be-

rechnung des Virusgehaltes oder Infektiositätstiters maßgeblich ist, bei der noch 50% der eingesetzten Reagenten einen virusspezifischen, ablesbaren Effekt ausbilden, die also einen 50%-Wert ermittelt (KID_{50}), und der Auszählung der von Viren einer Verdünnungsstufe noch hervorgerufenen Einzeleffekte, somit einem 100% Wert (hier Plaquezählmethode) mit jeweiliger abschließender Hochrechnung auf den Ausgangs-Virusgehalt. In der Abwägung beider Methoden bestätigte sich die Erfahrung, daß der Endtiter (KID_{50}) für die eigenen Vergleiche besser geeignet ist, weil die Berechnung der 50%-Dosis einheitlichere Werte liefert, weniger Streuung und bessere Reproduzierbarkeit aufweist. Beim Vergleich der verschiedenen OPV-Stämme fiel ferner zugunsten des KID_{50} -Wertes ins Gewicht, daß das sehr differierende Plaquebildungsvermögen mehr von Faktoren wie Vermehrungsintensität je Zellsystem, Ausbreitungstendenz der Viren in den Zellen und deren gleiche Empfänglichkeit beeinflußt wird. Bedingt durch die Infektionstechnik sind für die Ausbildung eines zählbaren Plaques oft mehrere (aggregierte) Viren erforderlich und die Verteilung des infizierenden Virus im Zellsystem schlechter. Auswertbar waren zudem nur Plaques, die innerhalb von 2 Tagen ausgebildet waren. Beispiele für die Nachteile im Plaquetest sind die Nicht-VV-Stämme RRV, KR-58, APV wie auch BPV, aber auch die Neuro-VV-Stämme und die V-TT-Mutante. Demgegenüber steht ein viel günstigeres Verhältnis bei den anderen VV-Stämmen. Für die anschließenden Vergleiche zwischen der Infektiosität und den anderen Meßverfahren waren folglich in erster Linie die KID_{50} -Werte geeignet.

Im ersten auf die Fragestellung bezogenen Vergleich war jeweils die Infektiosität der einzelnen OPV-Stämme den im EM gezählten morphologischen bzw. physikalischen Viruspartikeln gegenüberzustellen. Bisherige Vergleiche dieser Art bei Pockenviren in älteren Berichten (Zusammenfassung bei SHARP, 1965) wiesen darauf hin, daß, wie bei anderen Virusarten auch, im EM z.T. erheblich mehr Viruspartikel nachweisbar sind, als aus der Infektiosität zu erwarten wären, bei OPV zwischen 1:4 und 1:5000.

Diesbezügliche Vergleiche bei den eigenen 18 OPV-Stämmen ergaben sehr große Unterschiede. Auf 2 (V-MVA) bis zu etwa 800 (EPV, OPV-85) bzw. sogar 1585 (CPV) im EM gezählten bzw. hochgerechneten Partikel fiel eine infektiöse KID₅₀. Diese Zahlenverhältnisse sind unter Berücksichtigung der Streuungen in den Meßverfahren mit Vorsicht, also nur als Vergleichswerte zu betrachten. Der Idealwert von 1:1 wurde nur beim hoch an das Nachweissystem (FHE-Zellen) adaptierten V-MVA annähernd kalkuliert, ähnlich beim in homologen MA-Zellen nachgewiesenen APV. Die Vermehrungsverhältnisse bei den zwischenrangierenden OPV-Stämmen weisen auf deren schlechtere Vermehrungstendenz und Virulenz für die überwiegend heterologen Zellsysteme hin, in denen sie vermehrt wurden. Hinzu kommt die langsamere Vermehrung dieser Stämme und die damit verbundenen vermehrten Einflüsse antiviraler Faktoren im Kultursystem. Offen bleibt dabei, ob, außer den in vivo-Systemen, besser geeignete Kulturzellen überhaupt verfügbar sind. Die Daten lassen aber erkennen, daß bei VV-Stämmen bei der Vermehrung in voll empfänglichen Kulturzellen auf ein infektiöses Virus mit bis zu 10 und darüber nichtvermehrungsfähigen (unreifen oder inaktiven) Viren zu rechnen ist, bei anderen OPV-Stämmen mit noch vielfach mehr.

Die Erfassung auch nicht-infektiöser Partikel im EM macht auch deutlich, warum in Proben von OPV-infiziertem Gewebe, trotz vielfach geringem, über die Züchtung gemessenem Virusgehalt, Virus nachweisbar und eine Diagnose möglich wird. Im Gewebe enthaltene nicht oder nicht mehr infektiöse Viren werden zusätzlich erfaßt. Bestätigen ließ sich auch die bei Pockenviren vorliegende Erfahrung, daß sie im EM, ohne vorausgegangene Konzentrationsverfahren, direkt nachweisbar sind, wenn etwa 10⁶ Partikel in 1 ml zu untersuchender Suspension vorliegen, unabhängig von der Infektiosität dieser Suspension.

Bei der Analyse der Nachweisbarkeit von OPV-Stämmen im ELISA ist immer zu berücksichtigen, daß bei diesem Verfahren nicht allein die Antigenkonzentration, hier eingeschlossen die zu vergleichende Partikelzahl und deren Infektiosität, eine Rolle spielt, sondern auch die mehr oder weniger gute Bindungsaffi-

nität der OPV-Stämme zum im ELISA-System vorgelegten und mitbestimmenden Antikörpers (AK). Für die eigenen Vergleiche wurden zwei gegen V-MVA induzierte AK-Arten eingesetzt, ein polyklonales und ein monoklonales Immunserum. Ermitteln ließ sich zunächst die Erfäßbarkeit im ELISA der heterogenen OPV-Stämme in diesen zwei ELISA-Systemen. Die Ergebnisse drücken aber auch die serologischen Beziehungen der OPV-Stämme zum V-MVA-Referenzstamm bzw. dessen AK aus, d.h. wie gut sie relativ zum V-MVA, das dabei als 100%-Standard dient, in den Nachweissystemen erfaßt werden.

Im ELISA mit **polyklonalen** anti-V-MVA-AK reagierten alle 18 OPV-Stämme, wenn auch mit stark differierender Intensität. Die hier vorliegenden vielfältigen gegen vielerlei MVA-Virusproteine gerichteten AK binden die anderen OPV-Stämme sehr unterschiedlich gut, die Streuung resultiert aus der differierenden antigenen "Verwandtschaft". Der im zweiten ELISA-System eingesetzte **monoklonale** anti-V-MVA-AK mußte wesentlich (V-MVA bzw. VV) spezifischere Ergebnisse zeigen. Dieser MAK bindet im Immunoblot nur an eine Doppelproteinbande der OPV (35 KD), die dem APV und dem MPV fehlt (CZERNY et al., 1988b). Der Großteil der OPV-Stämme jedoch wurde in diesem ELISA unter vergleichsweise geringer Streuung gebunden. Insbesondere die enge Beziehung der meisten VV untereinander sowie zu RPV und KR-58 wurde deutlich.

Die Ergebnisse beim Nachweis der OPV-Stämme in beiden ELISA-Systemen machten aber auch deutlich, daß Vergleiche der ELISA-Titer mit den anderen Parametern PZ und KID₅₀ nur soweit möglich sind, als einheitlich gute Bindungen aufgrund enger serologischer Beziehungen der Stämme erfolgten, nämlich innerhalb der Mehrzahl der VV-Stämme und zu RPV bzw. KR-58. Eine solche Auswertung ließ eine wesentlich bessere Beziehung der ELISA-Titer zu den Partikelkonzentrationen der Kulturvirussuspensionen erkennen, als zu deren Gehalt an vermehrungsfähigem infektiösen Virus. Obwohl im ELISA neben den morphologisch kompletten Viruseinheiten auch "gelöste" Virusproteine der Kulturvirusernten mitreagieren, dürften die Partikelkonzentrationen im Verhältnis den Ausschlag geben. Diese Annahme wird durch Ergebnisse ähnlicher Vergleiche mit ELISAs an hochgerei-

nigten OPV in institutsintern vorgenommenen Versuchen bestätigt. Somit ist auch sehr wahrscheinlich, daß diese Beziehung ELISA-Bindung zu PZ - jeweils die Verwendung hochaffiner AK im ELISA vorausgesetzt - auch für andere, Nicht-Vaccinia-OPV gegeben ist.

Die besonderen Beziehungen zwischen der Nachweisbarkeit in einem empfindlichen serologischen Test wie dem ELISA und den partikulären Verhältnissen bei OPV wurden am Beispiel von drei OPV-Stämmen deutlich, bei denen Virus durch mehrere unterschiedliche Verfahren quantitativ inaktiviert wurde. Die Mehrzahl dieser Proben reagierte trotz überwiegender oder vollständiger Eliminierung der Infektiosität noch befriedigend bis sehr gut im ELISA und besser mit den monoklonalen als den polyklonalen anti-V-MVA-AK. β -Propiolakton z.B. inaktivierte die OPV vollständig, beeinträchtigte dabei aber nicht die für die Bindung im ELISA maßgeblichen viralen Epitope. Die Beziehung der ELISA-Werte zu den Partikelkonzentrationen blieb erhalten. Auch durch die anderen eingesetzten Inaktivierungsmittel, ausgenommen Formalin, wurden diejenigen Virus- bzw. Antigenaktivitäten kaum geschädigt, die für die Reaktion mit den MAK maßgeblich sind. Hauptsächlich handelte es sich hier um das KD35-Protein der OPV. Von formalininaktivierten Proben wurden offensichtlich nur noch die wenigen Viruspartikel "erkannt", die noch intakte KD 35-Epitope aufwiesen.

Im ELISA mit vorgegebenen polyklonalen anti-V-MVA-AK, ein Gemisch unterschiedlicher AK gegen eine Vielzahl von Virusproteinen, die mehr bzw. überwiegend empfindlicher gegen die Inaktivierungsmittel sind, waren die Bindungen wesentlich schwächer. Die Inaktivierung zerstörte nicht nur die Infektiosität, sondern schädigte - wahrscheinlich durch Proteindenaturierung - viele Epitope von Bindungskompetenz, evtl. ausgenommen das KD35-Protein, das mit dem MAK noch gut erfaßbar war. Die vergleichsweise starke Minderung der ELISA-Titer im polyklonalen System nach Inaktivierung der meisten Virusproben können deshalb nicht unmittelbar der eliminierten Infektiosität zugeordnet werden.

Über die Vor- und Nachteile der verglichenen Meßmethoden für Orthopockenviren lassen sich aufgrund der Ergebnisse Aussagen machen, die bisher erworbene empirische Erfahrungen bestätigen. Ein Virusnachweis an Hand der Infektiosität, d.h. über die Virusvermehrung in geeigneten Zellsystemen, wird immer dann optimal sein und diagnostisch am besten, wenn in einer Probe nur wenige, aber immerhin etwa 10 bis 100 infektionstüchtige Viruspartikel zu erwarten und enthalten sind. Bei frischen Proben infizierter Gewebe ist dies die Regel. Im Elektronenmikroskop lassen sich OPV nur dann nachweisen, wenn eine ausreichende Konzentration, mindestens 10^5 , besser 10^6 Partikel pro g oder ml an morphologisch identifizierten Viren vorliegen, unabhängig vom Anteil der infektionstüchtigen Einheiten. Dabei darf damit gerechnet werden, daß auch hier in OPV-infizierten spezifisch betroffenen Zellsystemen meist die genannte Partikelkonzentration anzutreffen ist. Gleiches bezüglich Verhältnis vom Anteil an aktiven und inaktiven Viren gilt für den Nachweis im ELISA als "Antigenfänger", die Verwendung von ausreichend affinen, möglichst spezifisch bindenden AK vorausgesetzt. Die Empfindlichkeit eines solchen ELISA-Nachweissystems ist dabei nachweislich mindestens 10-fach, im optimalen System wahrscheinlich bis 100-fach höher einzustufen, als der elektronenoptische Nachweis bei OPV.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Kulturvirussuspensionen von 18 verschiedenen Orthopockenvirusstämmen wurden elektronenoptisch auf ihren Gehalt an Viruspartikeln, durch Titrierung in zwei Verfahren auf ihren Anteil an infektiösem Virus und im ELISA auf ihre Reaktion gegen spezifische Antikörper untersucht. An drei Stämmen wurden gleiche Messungen auch nach der Inaktivierung mit einigen physikalischen und chemischen Mitteln vorgenommen. Die Ergebnisse aus den drei verschiedenen Analysen wurden verglichen, um quantitative Beziehungen zwischen der Infektiosität, der Viruspartikelkonzentration und der Reaktivität im ELISA der Orthopockenviren aufzuzeigen.

Als Vergleichswerte der Infektiosität eigneten sich die mit der Endverdünnungsmethode ermittelten KID_{50} -Werte besser als der Gehalt an plaquebildenden Einheiten.

Über die Auszählung im Elektronenmikroskop ließen sich für alle in Zellkulturen vermehrten Orthopocken-Stämme hohe und wenig differierende Partikelkonzentrationen berechnen. Im Vergleich mit der Infektiosität bestätigte sich, daß das Verhältnis zwischen infektiösen und nichtvermehrungsfähigen Viren einer Suspension sehr differieren kann. Die Meßwerte lagen zwischen 1:2 und über 1:1000. Die dafür maßgeblichen Faktoren, in erster Linie die Eignung der zur Vermehrung verwendeten Zellsysteme und die Vermehrungstendenz der Stämme, wurden diskutiert.

Im Vergleich der ELISA-Ergebnisse mit Infektiosität und Partikelzahl ließ sich erkennen, daß eine direktere und engere Beziehung zur Partikelzahl besteht als zum Gehalt einer Suspension an infektiösem Virus. Die Ergebnisse mit inaktivierten Virussuspensionen bestätigten diese Beziehung. Ein echter Vergleich und vollwertige Korrelationen sind aber nur dann zu vollziehen wenn im ELISA-System für die verschiedenen Orthopockenviren jeweils spezifische und hoch affine Antikörper, am besten ausgewählte homologe monoklonale Antikörper, verwendet werden.

In der praktischen Labordiagnose von Orthopockenviren bieten die drei untersuchten Nachweisverfahren spezifische Vor- und Nachteile. Im Elektronenmikroskop können Pockenviren unabhängig von ihrer Infektiosität nachgewiesen werden, wenn in Proben mindestens 10^5 , besser 10^6 Partikel pro g oder ml vorliegen. Dies gilt auch für den Nachweis im ELISA, der, je nach Orthopockenstamm, aufgrund der Ergebnisse 10- bis 100-fach empfindlicher einzuschätzen ist, die Verwendung optimal spezifischer Antikörper vorausgesetzt. Für kleine Virusmengen in Proben mit wenigen vermehrungsfähigen Orthopockenviren ist allein die Züchtung im möglichst optimal permissiven Zellsystem die Nachweismethode der Wahl.

SUMMARY

Analytical studies with orthopoxviruses on the relations between particle concentration, infectivity and reactivity in an ELISA

Culture virus suspensions of 18 orthopoxvirus strains were investigated with an electron microscope for virus particle content, underwent two different titrations to establish the amount of infectious virus and were tested in an ELISA for their reaction to specific antibodies. In the case of three strains, the same procedures were repeated after chemical and physical inactivation. The results of the three different analytical procedures were compared in order to demonstrate the relations between infectivity, particle concentration and reactivity of orthopoxviruses in an ELISA.

KID₅₀ values obtained from titration in microplates proved to be more suitable for a comparison of the infectivity than the quantity of plaque forming units. Using an electron microscope, it was possible to establish similarly high particle concentrations for all those orthopox strains reproduced in cell cultures. In the comparison with infectivity, it was confirmed that in a suspension the relation between infectious virus and virus incapable of reproduction can vary greatly. The values were between 1:2 and over 1:1000. The reasons for this, mainly the suitability of the cell systems used for reproduction and the ability of the various strains to reproduce, were discussed. When the ELISA results were compared with the infectivity and number of particles it was observed that there is a closer, more direct relation to the number of particles than to the virus content of a suspension. The results obtained with inactivated virus suspensions confirmed this. However, a genuine comparison and good correlations are only possible when specific antibodies, preferably selected homologous monoclonal antibodies with high affinity, are used in the ELISA test for the different orthopox viruses.

All three detection procedures showed specific advantages and disadvantages in practical laboratory diagnosis of orthopox viruses. In the electron microscope, pox viruses can be detected independently of their infectivity, provided that the samples contain 10^5 , or preferably 10^6 , particles per g or ml. This is the same for detection in ELISA. According to the results obtained in the study, the ELISA test is 10 to 100 times more sensitive, depending on the orthopox strain and providing specific antibodies are used. The method of choice in samples with small amounts of virus and only a few orthopoxviruses able to reproduce is cultivation in optimally permissive cell systems.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ALMEIDA, J.D., 1983:

Uses and abuses of diagnostic electron microscopy.

In: New developments in diagnostic virology.

BACHMANN, P.A. (ed.),

Springer Verlag, Berlin/Heidelberg

APPLEYARD, G., A.J. HAPPEL, E.A. BOULTER, 1971:

An antigenic difference between intracellular and extra-cellular rabbitpox virus.

J. gen. Virol. 13, 9 - 17

ARITA, M., I. TAGAYA, 1980:

Virion polypeptides of poxviruses.

Arch. Virol. 63, 209 - 225

ARSTILA, P., 1976:

Quantitative studies on adsorption, elution and haemagglutination of vesicular stomatitis virus.

Arch. Virol. 21, 437 - 446

BABLANIAN, R., 1984:

Poxvirus cytopathogenicity: Effects on cellular macromolecular synthesis.

In: Comprehensive Virology 19, 391 - 429.

FRAENKEL-CONRAT, H., R.R. WAGNER (eds.),

Plenum Press, New York.

BAXBY, D., 1977:

Poxvirus hosts and reservoirs.

Arch. Virol. 55, 169 - 179.

BAXBY, D., M. BENNET, R.M. GASKELL, C.J. GASKELL, D.F. KELLY, 1985:

The laboratory diagnosis of orthopoxvirus infection in the domestic cat.

J. small Anim. Pract. 26, 653 - 661.

- BAXBY, D., R.M. GASKELL, C.J. GASKELL, M. BENNETT, 1986:
Ecology of orthopoxviruses and use of recombinant
vaccinia vaccines.
Lancet ii, 850 - 851.
- BAXBY, D., D.P. CASEMORE, E.S. EMSLIE, D.K. WHYLER,
M. BENNETT, A.B. DAVIS, 1987:
Cowpox in a child, acquired from a cat.
Clin. Exp. Dermat. 12, 286 - 287.
- BENNETT M., C.J. GASKELL, R.M. GASKELL, M. Bennet,
T.J. GRUFFYDD-JONES, 1986:
Poxvirus infection in the domestic cat: Some clinical and
epidemiological observations.
Veterinary Record 118, 387 - 390.
- BIEBER, F., 1985:
Biotinylierung monoklonaler Antikörper.
In: Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakteri-
sierung, 109 - 212
PETERS, J.H. u.a. (eds.),
Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.
- BONIN, O., 1973:
Quantitativ-virologische Methodik.
Thieme Verlag, Stuttgart.
- BRODOROTTI, H., von STETTMUND, H. MAHNEL, 1982:
Vergleichende Untersuchungen zur UV-Empfindlichkeit von
Viren.
Zbl. Vet. Med. B 29, 129 - 136.
- CHEVILLE, N.F., I. AMES, 1975:
Cythopathology in viral diseases.
In: Monographs in Virology, 10.
MELNICK, J.L. (ed.),
Karger Verlag, Basel/München.

CZERNY, C.-P., H. MEYER, H. MAHNEL, 1988a:

Development of an ELISA, using neutralizing monoclonal antibodies for detection of orthopoxvirus.

VII. International meeting on poxvirus/iridovirus;
Heidelberg, BRD; 1988, August.

CZERNY, C.-P., H. MAHNEL, A. MAYR, O. HORNSTEIN, 1988b:

Importance of structural components in orthopox-viruses for humoral and cell-mediated immunity (paramunity): Analysis with neutralizing monoclonal antibodies and anti-idiotypic antibodies.

VII. International meeting on poxvirus/iridovirus;
Heidelberg, BRD; 1988, August.

DALES, S., R. KAJIOKA, 1964:

The cycle of multiplication of vaccinia virus in earle's strain L cells - I. Uptake and penetration.

Virology 24, 278 - 294.

DALES, S., B.G.T. POGO, 1981:

Biology of poxviruses.

In: Virology monographs, 18.

KINGSBURY, D.W., H. ZUR HAUSEN (eds.),
Springer Verlag, Wien/New York.

DALES, S., R.S. FUJINAMI, M.B.A. OLDSTONE, 1983:

Infection with vaccinia favors the selection of hybridomas synthesizing autoantibodies against intermediate filaments, one of them cross-reacting with the virus hemagglutinin.

J. Immunol. 131, 1546 - 1553.

DALLO, S., J.F., RODRIGUEZ, M. ESTEBAN, 1987:

A 14K envelope protein of vaccinia virus with an important role in virus-host cell interactions is altered during virus persistence and determines the plaque size phenotype of the virus.

Virology 159, 423 - 432.

DALLO, S., M. ESTEBAN, 1987:

Isolation and characterization of attenuated mutants of vaccinia virus.

Virology **159**, 408 - 422.

DUNLAP, R.C., L.F. BARKER, 1973a:

Vaccinia virus strain differences - I. Neutralization of vaccinia virus strains by homologous and heterologous antisera.

Arch. ges. Virusforsch. **42**, 107 - 116.

DUNLAP, R.C., L.F. BARKER, 1973b:

Vaccinia virus strain differences - II. Altered dermal reactivity of vaccinia virus by single passage in a new host system.

Arch. ges. Virusforsch. **42**, 117 - 124.

ESPOSITO, J.J., J.F. OBIJESKI, J.H. NAKANO, 1977:

Serological relatedness of monkeypox, variola and vaccinia viruses.

J. Med. Virol. **1**, 35 - 47.

ESPOSITO, J.J., G. MÜLLER, A. MEYER, F. GRAS, P. EMMERICH, T. KOLAKOWSKI, 1988:

Monkeypox virus in liver and spleen of child in Gabon. Lancet ii, 769 - 770.

ESSANI, K., S. DALES, 1979:

Biogenesis of vaccinia: Evidence for more than 100 polypeptides in the virion.

Virology **95**, 385 - 394.

FENNER, F., 1979:

Portraits of viruses: The poxviruses.

Intervirology **11**, 137 - 157.

GALASSO, G.J., D.G. SHARP, 1962:

Virus particle aggregation and the plaque-forming unit.

J. Immunol. **88**, 339 - 347.

GALASSO, G.J., G.G. SHARP, 1963:

Quality and yield of vaccinia virus from L cell cultures.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **113**, 43.

GALASSO, G.J., J.D. SHARP, D.G. SHARP, 1964:

The influence of degree of aggregation and virus quality
on the plaque titer of aggregated vaccinia virus.
J. Immunol. **92**, 870 - 882.

GALASSO, G.J., 1967:

Quantitative studies on the quality, effects of
aggregation and thermal inactivation of vesicular
stomatitis virus.
Arch. ges. Virusforsch. **21**, 437 - 446.

GANGEMI, J.D., D.G. SHARP, 1978:

Particle heterogeneity in vaccinia virus populations
during passage.
Virology **85**, 262 - 270.

GARON, C.F., B. MOSS, 1971:

Glycoprotein syntheses in cells infected with vaccinia
virus: A glycoprotein component of the virion.
Virology **46**, 233 - 246.

GEHRING, H., H. MAHNEL, H. MAYER, 1972:

Elefantenpocken.
Zbl. Vet. Med. B **19**, 258 - 261.

HARPER, L., H.S. BEDSON, A. BUCHAN, 1979:

Identification of orthopoxviruses by polyacrylamide gel
electrophoresis of intracellular polypeptides - I. Four
major groupings.
Virology **93**, 435 - 444.

HILLER, G., K. WEBER, 1982:

A phosphorylated basic vaccinia virion polypeptide of molecular weight 11,000 is exposed on the surface of mature particles and interacts with actin-containing cytoskeletal elements.

J. Virol. **44**, 647 - 657.

HILLER, G., K. WEBER, 1985:

Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptid are used for vaccinia virus envelopment.

J. Virol. **55**, 651 - 659.

HOLL, U., P. SOLISCH, 1984:

Zur quantitativen Partikelbestimmung in der Elektronenmikroskopie.

Arch. exper. Vet. med. **38**, 923 - 943.

HOLOWCZAK, J.A., W.K. JOKLIK, 1967a:

Studies on the structural proteins of vaccinia virus - II. Kinetics of the synthesis of individual groups of structural proteins.

Virology **33**, 726 - 739.

HOLOWCZAK, J.A., W.K. JOKLIK, 1967b:

Studies on the structural proteins of vaccinia virus - I. Structural proteins of virions and cores.

Virology **33**, 717 - 725.

HOLOWCZAK, J.A., 1972:

Uncoating of poxviruses.

Virology **50**, 216 - 232.

HORNSTEIN, O., 1987:

Versuche zur Überprüfung der Immunität gegen Orthopockenviren im Mäusemodell.

Vet. Med. Diss., München.

HORZINEK, M.C., H.F. EGBERINK, A. WILLEMSE, 1986:

Isolation and identification of a poxvirus from a domestic cat and a human contact case.

J. Vet. Med. B 33, 237 - 240.

ICHIHASHI, Y., S. MATSUMOTO, S. DALES, 1971:

Biogenesis of poxviruses: Role of a-type inclusions and host cell membranes in virus dissemination.

Virology 46, 507 - 532.

ICHIHASHI, Y., 1977:

Vaccinia - specific haemagglutinin.

Virology 76, 527 - 538.

ICHIHASHI, Y., M. OIE, 1980:

Adsorption and penetration of the trypsinized vaccinia virus.

Virology 101, 50 - 60.

ICHIHASHI, Y., M. OIE, T. TSURUHARA, 1984:

Location of DNA-binding proteins and disulfide-linked proteins in vaccinia virus structural elements.

J. Virol. 50, 929 - 938.

ICHIHASHI, Y., M. OIE, 1988:

Epitope mosaic on the surface proteins of orthopox-viruses.

Virology 163, 133 - 144.

IKUTA, K., H. MIYAMOTO, S. KATO, 1979:

Two components specifically responsible for haemagglutination.

Virology 96, 327 - 331.

IKUTA, K., H. MIYAMOTO, S. KATO, 1987:

Studies on the polypeptied of poxvirus.

Biken Journal 21, 51 - 61.

- JANECZKO, R.A., J.F. RODRIGUEZ, M. ESTEBAN, 1987:
Studies on the mechanism of entry of vaccinia virus in animal cells.
Arch. Virol. **92**, 135 - 150.
- JEZEK, Z., B. GRAB, H. DIXON, 1987a:
Stochastic model for interhuman spread of monkeypox.
Am. J. Epidemiol. **126**, 1082 - 1092.
- JEZEK, Z., M. SZCZENIEWSKI, K.M. PALUKU, 1987b:
Human monkeypox: Clinical Features of 282 patients.
J. Infect. Dis. **156**, 293 - 299.
- JEZEK, Z., B. GRAB, K.M. PALUKU, M.V. SZCZENIEWSKI, 1988a:
Human Monkeypox: Disease pattern, incidence and attack rates in a rural area of Northern Zaire.
Trop. Geogr. Med. **40**, 73 - 83.
- JEZEK, Z., B. GRAB, M. SZCZENIEWSKI, K.M. PALUKU, M. MUTOMBO, 1988b:
Clinico-epidemiological features of monkeypox patients with an animal or human source of infection.
Bull. WHO **66**, 459 - 464.
- JEZEK, Z., B. GRAB, M. SZCZENIEWSKI, K.M. PALUKU, M. MUTOMBO, 1988c:
Human monkeypox: Secondary attack rates.
Bull. WHO **66**, 465 - 470.
- JOKLIK, W.K., 1962:
The purification of four strains of poxvirus.
Virology **18**, 9 - 18.
- JOKLIK, W.K., 1966:
The poxviruses.
Bacteriol. Rev. **30**, 33 - 66.
- KAO, S., W.R. BAUER, 1987:
Biosynthesis and phosphorylation of vaccinia virus structural protein VP 11.
Virology **159**, 399 - 407.

KAPLAN, C., R.C. VALENTINE, 1959:

The infectivity of purified and partially purified preparations of vaccinia and cowpox viruses.

J. gen. Microbiol. **20**, 612.

KATZ, E., E. MARGALITH, 1973:

Location of vaccinia virus structural polypeptides on the surface of the virus particle.

J. gen. Virol. **18**, 381 - 384.

KAY, D.H., 1965:

Techniques for electron microscopy.

Alden Press, Oxford.

KERN, R., 1987:

Versuche zur serologischen Charakterisierung von Orthopoxvirus mit Hilfe monoklonaler Antikörper.

Vet. Med. Diss., München.

KITAMOTO, N., E. GOTO, S. TANIMOTO, T. TANAKA, H. MIYAMOTO,

N. WAKAMIYA, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO, 1984:

Cross-Reactivity between cowpox and vaccinia viruses with monoclonal antibodies.

Arch. Virol. **82**, 129 - 136.

KITAMOTO, N., S. TANIMOTO, K. HIROI, T. TANAKA, H. MIYAMOTO,

N. WAKAMIYA, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO, 1986:

Polypeptide analysis with monoclonal antibodies of a-type inclusion bodies induced by cowpox virus.

Arch. Virol. **89**, 15 - 28.

KITAMOTO, N., S. TANIMOTO, K. HIROI, M. OZAKI, H. MIYAMOTO,

N. WAKAMIYA, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO, 1987:

Monoclonal antibodies to cowpox virus: Polypeptide analysis of several major antigens.

J. gen. Virol. **68**, 239 - 246.

MAA, J., M. ESTEBAN, 1987:

Structural and functional studies of a 39,000-Mr immunodominant protein of vaccinia virus.
J. Virol. **61**, 3910 - 3919.

MADIN, S.H., P.C. ANDRIESE, N.B. DARBY, 1957:

The in vitro cultivation of tissues of domestic and laboratory animals.
Am. J. Vet. Res. **18**, 932 - 941.

MAHNEL, H., 1961:

Tierexperimentelle Arbeiten mit Vakzine-Antigen -
Das Antikörperbild des Kaninchens nach kombinierter
Impfung mit inaktiviertem und aktivem Vakzinevirus.
Arch. ges. Virusforsch. **11**, 658 - 666.

MAHNEL, H., 1965:

Cytotoxische Wirkung von Pockenviren.
Zeitschr. Hyg. **151**, 185 - 198.

MAHNEL, H., G. BARTENBACH, 1973:

Systematisierung des Kamelpockenvirus (KPV).
Zbl. Vet. Med. B **20**, 572 - 576.

MAHNEL, H., 1974:

Labordifferenzierung der Orthopockenviren.
Zbl. Vet. Med. B **21**, 242 - 258.

MAHNEL, H., 1986:

Identifizierung eines Kuhpockenvirus, isoliert von einem
Kind.
J. Vet. Med. B **33**, 362 - 370.

MAHNEL, H., 1987:

Experimentelle Ergebnisse über die Stabilität von Pocken-
viren unter Labor- und Umweltbedingungen.
J. Vet. Med. B **34**, 449 - 464.

MALLON, V., J.A. HOLOWCZAK, 1985:

Vaccinia virus antigens on the plasma membrane of infected cells - I. Viral antigens transferred from infecting virus particles and synthesized after infection.

Virology 141, 201 - 220.

MARENNIKOVA, S.S., E.B. GURVICH, E.M. SHELUKHINA, 1971:

Comparison of the properties of five pox virus strains isolated from monkeys.

Arch. ges. Virusforsch. 33, 201 - 210.

MARENNIKOVA, S.S., N.N. MALCEVA, N.A. HABAHASEVA, 1981:

ELISA - a simple test for detecting and differentiating antibodies to closely related orthopoxviruses.

Bull. WHO 59, 365 - 369.

MARENNIKOVA, S., L. KHODAKEVICH, M. SZCZENIEWSKI, Z. JEZEK, J. NAKANO, F. MEIER, 1987a:

Monkeypox Virus in relation to the ecological features surrounding human settlements in Bumba Zone, Zaire.

Trop. Geogr. Med. 39, 56 - 63.

MARENNIKOVA, S., M. SZCZENIEWSKI, Z. JEZEK, L. KHODAKEVICH, J. NAKANO, F. MEIER, 1987b:

The role of squirrels in sustaining monkeypox virus transmission.

Trop. Geogr. Med. 39, 115 - 122.

MARENNIKOVA, S.S., F.G. NAGIEVA, G.R. MATSEVICH,

E.M. SHELUKHINA, A.A. KHABAKHPASHEVA, G.M. PLATONOVA, 1988:

Monoclonal antibodies to monkey pox virus: Preparation and application.

Acta Virol. 32, 19 - 26.

MATTHEWS, R.E.F., 1982:

Fourth report of the international committee on taxonomy of viruses: Classification and nomenclature of viruses.

Intervirology 17, 1 - 200.

MAYR, A., 1955:

Experimentelle Arbeiten über die Pockenerreger.
Habilitationsschrift, München.

MAYR, A., 1957:

Ein Beitrag zum Problem der qualitativen Differenzierung
einzelner Vaccinevirusstämme.
Zbl. Bakt. I Orig. **171**, 7 - 17.

MAYR, A., K. KALCHER, 1960:

Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügel-
pocken in der Zellkultur.
Arch. ges. Virusforsch. **10**, 72 - 102.

MAYR, A., E. MUNZ, 1965:

Die Pockenschutzimpfung (Das Vacciniavirus).
In: Handbuch der Schutzimpfungen (Sonderdruck).
HERRLICH, A.(ed.),
Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.

MAYR, A., 1966:

Eine einfache und schnelle Methode zur Differenzierung
zwischen Vaccine- (poxvirus officinale) und Kuhpocken-
virus (poxvirus bovis).
Zbl. Bakt. I Orig. **199**, 144 - 151.

MAYR, A., H. MAHNEL, E. MUNZ, 1972:

Systematisierung und Differenzierung der Pockenviren.
Zbl. Vet. Med. B **19**, 69 - 88.

MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN, 1974:

Virologische Arbeitsmethoden - Teil I.
Jena, VEB, Gustav Fischer Verlag.

MAYR, A., V. HOCHSTEIN-MINTZEL, H. STICKL, 1975:

Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten
Vaccinia-Stammes MVA.
Infection **3**, 6 - 14.

MAYR, A., 1976:

TC-Marker des attenuierten Vaccinia-Impfstammes "MVA" in menschlichen Zellkulturen.

Zbl. Vet. Med. B 23, 417 - 430.

MAYR, A., G. EISSNER, B. MAYR-BIBRACK, 1984:

Handbuch der Schutzimpfungen.

Paul Parey Verlag, Berlin/Hamburg.

McGUIRE, P.M., R.C. DUNLAP, D.G. SHARP, 1973:

Physical markers of change in a virion population during passage.

J. Infect. Dis. 127, 278 - 283.

MELNICK, J.L., K.O. SMITH, 1962:

Electron microscopic counting of virus particles by sedimentation on aluminized grids.

J. Immunol. 89, 279 - 284.

MELNICK, J.L., F. RAPP, 1964:

Applications of tissue culture methods in the virus laboratory.

In: Progress in medical virology, Vol. 6.

MELNICK, J.L. (ed.),

Karger Verlag, Basel.

MORRISON, D.K., J.K. CARTER, R.W. MOYER, 1985:

Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against two subunits of rabbit poxvirus-associated, DNA-directed RNA-polymerase.

J. Virol. 55, 670 - 680.

MOSS, B., E.N. ROSENBLUM, C.F. GARON, 1971:

Glycoprotein synthesis in cells infected with vaccinia virus - Non-virion glycoproteins.

Virology 46, 221 - 232.

MOSS, B., 1974:

Reproduction of poxviruses.

In: Comprehensive Virology 3, 405 - 458.

FRAENKEL-CONRAT, H., R.R.WAGNER. (eds.),
Plenum Press, New York.

MOSS, B., 1985a:

Replication of poxviruses.

In: Virology, 685 - 703.

FIELDS, B.N. (ed.),
Raven Press, New York.

MOSS, B., 1985b:

Vaccinia virus expression vector: A new tool for
immunologists.

Immunology Today 6, 243 - 245.

MUNZ, E., E.-M. KROPP, M. REIMANN, 1986:

Der Nachweis von Antikörpern gegen Orthopoxvirus cameli
in ostafrikanischen Dromedarseren mit einem ELISA.

J. Vet. Med. B 33, 221 - 230.

MÜLLER, G., 1970:

Negativkontrastierung von Viren.

In: Methodensammlung der Elektronenmikroskopie.

SCHIMMEL G., W.VOGEL (eds.),
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

NAGINGTON, J., R.W. HORNE, 1962:

Morphological studies of orf and vaccinia viruses.

Virology 16, 248 - 260.

NASEMANN, T., A. MAYR, G. SCHAEGER, W. KIMMIG, H. MAHNEL, 1987:

Infektion eines Mädchens mit Kuhpockenvirus.

Hautarzt 38, 414 - 418.

NERMUT, M.V., 1973:

Methoden der Negativkontrastierung.

In: Methodensammlung der Elektronenmikroskopie.

SCHIMMEL G., W.VOGEL (eds.),

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

NICHOLAS, A.H., W.P. McNULTY, 1968:

In vitro characteristics of a poxvirus isolated from
rhesus monkeys.

Nature **217** , 745 - 746.

OBERT, G., R. GLOECKLER, J. BURCKARD, M.H.V. VAN REGENMORTEL,
1981:

Comparison of immunosorbent electron microscopy, enzyme
immunoassay and counterimmunoelectrophoreses for
detection of human rotavirus in stools.

J. Virol. Meth. **3**, 99 - 107.

OIE, M., Y. ICHIHASHI, 1987:

Modification of vaccinia virus penetration proteins
analyzed by monoclonal antibodies.

Virology **157**, 449 - 459.

PAEZ, E., S. DALLO, M. ESTEBAN, 1987:

Virus attenuation and identification of structural
proteins of vaccinia virus that are selectively modified
during virus persistence.

J. Virol. **61**, 2642 - 2647.

PAEZ, E., M. ESTEBAN, 1988:

Stability of vaccinia virus DNA during persistent
infection: Accumulation of left-end deletions and of
tandem repeats at both ends of the viral genome and
prevention by interferon.

Virology **163**, 145 - 154.

PAYNE, L.G., 1978:

Polypeptide composition of extracellular enveloped
vaccinia virus.

J. Virol. **27**, 28 - 37.

PAYNE, L.G., 1979:

Identification of the vaccinia haemagglutinin polypeptide from a cell system yielding large amounts of extra-cellular enveloped virus.

J. Virol. **31**, 147 - 155.

PAYNE, L.G., 1980:

Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia.

J. gen. Virol. **50**, 89 - 100.

PAYNE, L.G., 1986:

The existence of an envelope on extracellular cowpox virus and its antigenic relationship to the vaccinia envelope.

Arch. Virol. **90**, 125 - 133.

PEDLEY, C.B., R.J. COOPER, 1987:

The assay, purification and properties of vaccinia virus-induced uncoating protein.

J. gen. Virol. **68**, 1021 - 1028.

PINTERING, L., T. JOUCE, 1965:

The lowered drop method for the preparation of specimens of partially virus lysates for qualitative electron micrographic analysis.

Virology **18**, 358 - 371.

RAMYAR, H., M. HESSAMI, 1972:

Isolation, cultivation and characterization of camel pox virus.

Zbl. Vet. Med. B **19**, 182-188.

REDDY, A.B., M.S. SETHI, 1983:

Adaption, cythopathic effect and growth cycle of a vaccinia virus in chick embryo fibroblast cell culture.

Annali della Facolta di Medicina Veterinaria, 149 - 163, Università degli Studi di Messina.

RODRIGUEZ, J.F., R. JANECZKO, M. ESTEBAN, 1985:

Isolation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies to vaccinia virus.

J. Virol. **56**, 482 - 488.

RODRIGUEZ, J.F., E. PAEZ, M. ESTEBAN, 1987:

A 14,000-Mr envelope protein of vaccinia virus is involved in cell fusion and forms covalently linked trimers.

J. Virol. **61**, 395 - 404.

ROLLE, M., A. MAYR, 1984:

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart, Ferd. Enke Verlag.

ROUMILLAT, L.F., J.L. PLATTON, M.L. DAVIS, 1984:

Monoclonal antibodies to a monkeypox virus polypeptide determinant.

J. Virol. **52**, 290 - 292.

SCHERER, G., 1981:

Ultrahistologische Untersuchungen über die Reaktionen homologer und heterologer Kulturzellen auf aktives und inaktives Avipoxvirus.

Vet. Med. Diss., München.

SHARP, D.G., 1965:

Quantitative use of the electron microscope in virus research - methods and recent results of particle counting.

In: Quantitative electron microscopy.

BAHR, G.F., E.H. ZEITLER (eds.),

International academy of pathology, Williams & Wilkins Company, Baltimore, Maryland (Laboratory Investigation, Vol. 14, No. 6, part 2).

SHARP, D.G., P.M. MCGUIRE, 1970:

Spectrum of physical properties among the virions of a whole population of vaccinia virus particles.

J. Virol. **5**, 275 - 281.

SMITH, E.C., B.C. PRATT, D. BAXBY, 1973:

In vitro dissociation and reconstitution of poxvirus haemagglutinin.

J. gen. Virol. **18**, 111 - 118.

SPAERMAN, C., G. KAERBER, 1931:

Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.

Arch. exp. Path. Pharmac. **162**, 480.

STERN, W., S. DALES, 1976a:

Biogenesis of vaccinia - Isolation and characterization of a surface component that elicits antibody suppressing infectivity and cell-cell fusion.

Virology **75**, 232 - 241.

STERN, W., DALES S., 1976b:

Biogenesis of vaccinia - Relationship of the envelope to virus assembly.

Virology **75**, 242 - 255.

TURNER, A., D. BAXBY, 1979:

Structural polypeptides of orthopoxvirus: their distribution in various members and location within the virion.

J. gen. Virol. **45**, 537 - 545.

WESTWOOD, J.C. N., H.T. ZWARTOUW, G. APPLEYARD, 1965:

Comparison of the soluble antigens and virus particle antigens of vaccinia virus.

J. gen. Microbiol. **38**, 47 - 53.

WILCOX, W.C., G.H. COHEN, 1969:

The poxvirus antigens.

In: C.T. in Microbiology 47, 1 - 19.

ARBER, u.a. (eds.),

Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.

WILTON, S., J. GORDON, S. DALES, 1986:

Identification of antigenic determinants by polyclonal
and hybridoma antibodies induced during the course of
infection by vaccinia virus.

Virology 148, 84 - 96.

WOKATSCH, R., 1972:

Vaccinia virus.

In: Strains of human viruses 241 - 257.

MAJER M., S. PLOTKIN (eds.),

Karger Verlag, Basel.

Hiermit danke ich all denen sehr herzlich, die mich bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes. Insbesondere gilt mein Dank meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. Mahnel, für die Vergabe des Themas sowie die jederzeit gewährte hilfreiche Unterstützung und Beratung zur Entstehung dieser Arbeit. Ferner bedanke ich mich bei Herrn Dr. Czerny, auf dessen wissenschaftlichen Untersuchungen und wertvollen Tips ein Teil der Ergebnisse basiert. Gleichzeitig danke ich allen Mitarbeiterinnen, die mir bei der Durchführung der Laborarbeiten sowie der formellen Erstellung des Manuskriptes behilflich waren.

Lebenslauf

geboren	20.05.1955, München
Eltern	Josef Guggenberger, Angestellter Elsa Guggenberger, Angestellte
Familienstand	ledig
Ausbildung	
1961	Volksschule, München
1967	Realschule, wirtschaftlicher Zweig, München
1971	Realschulabschluß: Mittlere Reife
1971	Übertrittsjahr für das Gymnasium, Salvator-Realschule München
1972	Erasmus-Grasser-Gymnasium, München
1975	Abitur, mathematisch-naturwissen- schaftlich, München
Wintersemester 1975/76	Ludwigs-Maximilians-Universität München, Fachrichtung: Kommunika- tionswissenschaften
Sommersemester 1976 bis Wintersemester 1981/82	Ludwigs-Maximilians-Universität München, Fachrichtung: Betriebs- wirtschaft
1982	Abschluß: Diplom-Kaufmann, Universität München
Wintersemester 1982/83	Ludwigs-Maximilians-Universität München, Beginn des Studiums der Veterinärmedizin
1988	Staatsexamen
Januar 1988	Beginn der vorliegenden Dissertation
1988	Approbation als Tierärztin

